(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월18일
(11) 등록번호 10-2719813
(24) 등록일자 2024년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 33/00 (2006.01) *A61L 27/34* (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01) *A61L 31/16* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 33/0029 (2013.01)
A61L 27/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7027247
(22) 출원일자(국제) 2019년03월08일
심사청구일자 2022년03월04일
(85) 번역문제출일자 2020년09월22일
(65) 공개번호 10-2020-0129114
(43) 공개일자 2020년11월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/055845
(87) 국제공개번호 WO 2019/170858
국제공개일자 2019년09월12일
(30) 우선권주장
18161058.5 2018년03월09일
유럽특허청(EPO)(EP)
18198422.0 2018년10월03일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
KR100143062 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
카르메다 아베
스웨덴 에스이-194 61 우플랜즈 배스비 카날배겐 3 비
(72) 발명자
안토니 퍼르
스웨덴 에스-194 61 우플랜즈 배스비 카날배겐 3 비 카르메다 아베 내
에릭손 말린
스웨덴 에스-194 61 우플랜즈 배스비 카날배겐 3 비 카르메다 아베 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 신유정, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 한인호

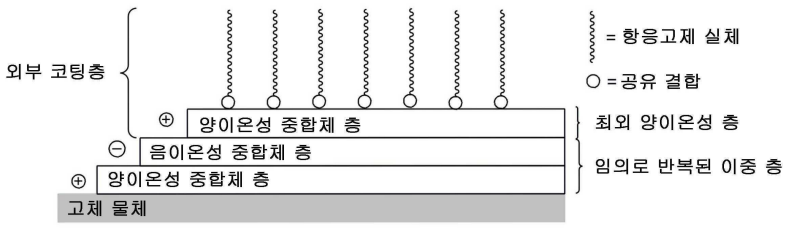
(54) 발명의 명칭 **생물학적 실체를 고정화하기 위한 방법에 대한 개선**

(57) 요 약

본 발명에 따르면, 그 중에서도 외부 코팅층이 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법으로서, i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계; ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

(뒷면에 계속)

대 표 도



iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및 v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계를 포함하며; 여기서, 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며, 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행되는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61L 31/10 (2013.01)

A61L 31/16 (2013.01)

A61L 33/0035 (2013.01)

A61L 33/0076 (2013.01)

A61L 2300/236 (2013.01)

A61L 2300/42 (2013.01)

A61L 2300/608 (2013.01)

A61L 2420/02 (2013.01)

A61L 2420/08 (2013.01)

(72) 발명자

갤하겐 안나

스웨덴 에스-194 61 우플랜즈 배스비 카날배겐 3비 카르메다 아베 내

코흐 에바

스웨덴 에스-194 61 우플랜즈 배스비 카날배겐 3비 카르메다 아베 내

니스트룀 다니엘

스웨덴 에스-194 61 우플랜즈 배스비 카날배겐 3비 카르메다 아베 내

포르히-그람 크리스티안

스웨덴 에스-194 61 우플랜즈 배스비 카날배겐 3비 카르메다 아베 내

궤란슨 헬레나

스웨덴 에스-194 61 우플랜즈 배스비 카날배겐 3비 카르메다 아베 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

i) 양이온성 중합체로 고체 물체(solid object)의 표면을 처리하는 단계;

ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

iii) 단계 i) 및 ii) 모두를 임의로 1회 이상 반복하는 단계;

iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체(entity)로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계

를 포함하는,

외부 코팅층이 항응고제 실체를 포함하고, 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법으로서,

음이온성 중합체는 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하며;

음이온성 중합체는 덱스트란 설페이트이며;

양이온성 중합체는 1차 또는 2차 아민기를 포함하고;

단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행되는 고체 물체의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 음이온성 중합체가 750 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 고체 물체의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 음이온성 중합체가 1,000 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 고체 물체의 제조 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 ii)가 0.25 M-4.0 M 의 염 농도에서 수행되는 고체 물체의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 단계 ii)가 0.25 M-3.0 M의 염 농도에서 수행되는 고체 물체의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 염이 염화나트륨, 황산나트륨, 인산수소나트륨 및 인산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택되는 고체 물체의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 염이 염화나트륨인 고체 물체의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 단계 i)의 양이온성 중합체가 임의로 가교된 폴리아민인 고체 물체의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 단계 iv)의 양이온성 중합체가 임의로 가교된 폴리아민인 고체 물체의 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 항응고제 실체가 헤파린 모이어티인 고체 물체의 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 헤파린 모이어티가 종점(end-point) 결합 헤파린 모이어티인 고체 물체의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 종점 결합 헤파린 모이어티가 이의 환원 단부를 통해 연결되는 고체 물체의 제조 방법.

청구항 13

양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체로서, 외부 코팅층이 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체를 포함하는 층이고;

음이온성 중합체는 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하며;

음이온성 중합체는 덱스트란 설페이트이고;

양이온성 중합체가 1차 또는 2차 아민기를 포함하는 고체 물체.

청구항 14

제13항에 있어서, 음이온성 중합체가 650 kDa-1,000 kDa, 1,000 kDa-4,500 kDa, 4,500 kDa-7,000 kDa 또는 7,000 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 고체 물체.

청구항 15

제13항에 있어서, 음이온성 중합체가 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 표면에 적용되는 고체 물체.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생물학적 실체를 포함하는 표면 코팅을 갖는 고체 물체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 헤파린과 같은 항응고제 실체 및 이에 의해 수득된 특정 생성물을 포함하는 개선된 표면 코팅을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 의료 장치가 신체에 이식되거나 체액과 접촉하면, 다수의 상이한 반응이 작동하여, 이들 중 일부는 염증을 일으키고 일부는 장치 표면과 접촉하여 혈액의 응고를 유발한다. 이러한 심각한 유해 효과를 상쇄하기 위해, 공지된 항응고제 화합물 헤파린은 의료 장치가 환자의 신체에 이식되기 전, 또는 환자의 체액과 접촉할 때 항혈전 효과를 제공하기 위해 환자에게 오랫동안 전신 투여되어 왔다.

[0003] 트롬빈은 몇 가지 응고 인자 중 하나이며, 이들 모두가 함께 작용하여 혈액과 접촉하는 표면에 혈전의 형성을 초래한다. 항트롬빈(항트롬빈 III으로도 알려져 있음)("ATIII")은 가장 탁월한 응고 억제제이다. 이것은 트롬빈 및 기타 응고 인자의 작용을 중화시켜 혈액 응고를 제한하거나 한정한다. 헤파린은 항트롬빈이 응고 인자를 억제하는 속도를 극적으로 향상시킨다. 헤파린 보조 인자 II("HCII")는 헤파린의 존재하에 트롬빈을 신속하게 억제하는 또 다른 응고 인자이다.

[0004] 그러나 고용량의 헤파린을 사용한 전신 치료는 종종 출혈이 우세한 심각한 부작용과 관련되어 있다. 헤파린 요법의 또 다른 드물지만 심각한 합병증은 혈전증(정맥 및 동맥 모두)으로 이어질 수 있는 헤파린 유발 혈소판 감소증(HIT: heparin induced thrombocytopenia)으로 지칭되는 알레르기 반응의 발생이다. 고용량 전신 헤파린 치료는 예컨대 수술 중 활성화된 응고 시간의 빈번한 모니터링(헤파린 요법을 모니터링하고 가이드하기 위해 사용됨)과 필요에 따라 해당하는 용량 조정도 또한 필요하다.

[0005] 따라서, 환자의 전신 헤파린화에 대한 필요성이 필요하지 않거나 제한될 수 있도록 해결책이 모색되었다. 이는 헤파린 및 기타 항응고제의 항응고 성질을 사용하는 의료 장치의 표면 개질을 통해 달성될 수 있을 것으로 생각

되었다. 따라서, 헤파린층을 의료 장치의 표면에 부착시킴으로써 표면 혈전저항성을 제공하는 다수의 다소 성공적인 기술이 개발되었다. 장기간의 생물 활성이 필요한 장치의 경우, 헤파린은 침출 및 분해에 대한 내성이 있어야 한다.

[0006] 헤파린은 사카라이드 단위에서 음으로 하전된 설페이트 및 카르복실산기를 운반하는 폴리사카라이드이다. 따라서 다가양이온성 표면으로의 헤파린의 이온 결합이 시도되었지만, 표면 개질은 표면에서 헤파린이 침출됨에 따라 안정성의 결여로 인한 기능의 결여를 초래하였다. 그 후, 헤파린이 표면상의 기에 공유결합되어 있는 상이한 표면 개질이 제조되었다.

[0007] 의료 장치를 혈전저항성으로 만드는 가장 성공적인 방법 중 한 방법은 헤파린 단편이 장치의 개질된 표면에 공유 결합하는 것이다. 일반적인 방법 및 이의 개선은 다양한 특허 문서에 기재되어 있다(이의 전체가 본원에 참조로 각기 포함되는 EP0086186A1, EP0086187A1, EP0495820B1 및 US6,461,665B1 참조).

[0008] 이들 문서는 말단 알데히드기를 보유하도록 개질된 헤파린을 1차 아미노기를 보유하도록 개질된 의료 장치의 표면과 반응시켜 헤파린화된 표면의 제조를 기재한다. 계 내에서 환원되어 안정한 2차 아민 링커를 형성하고, 이에 의해 헤파린을 공유적으로 고정화하는 중간체 쉬프 염기가 형성된다.

[0009] 헤파린의 활성을 유지하면서 표면에 공유 결합하는 헤파린에 대한 추가 방법은 WO2010/029189A2, WO2011/110684A1 및 WO2012/123384A1에 기재되어 있다(이들 각각은 그의 전체가 본원에 참고로 포함된다).

[0010] 항응고제 실체는 전형적으로 고체 물체의 표면에 직접 고정되기보다는 하나 이상의 중합체 또는 복합체 층으로 처리된 표면에 고정된다.

[0011] EP0086187A1은 복합체가 흡수된 표면 개질된 기재를 기재하고 있으며, 여기서 복합체는 1차 아미노 질소 작용기뿐만 아니라 2차 및/또는 3차 아미노 작용기, 및 2개의 알데히드기 사이에 1-4 개의 탄소 원자를 갖는 디알데히드를 함유하는 중합체 양이온성 계면 활성제이다. 음이온성 화합물은 추가로 상기 복합체, 및 임의로 추가의 양이온성 및 음이온성 교대 화합물에 결합될 수 있다.

[0012] EP0495820B1은 하기 단계를 포함하는 기재의 표면을 개질하는 방법을 기재한다: (a) 높은 평균 분자량의 폴리아민을 흡착시키고 상기 폴리아민을 크로톤알데히드와 가교시키는 단계; (b) 그 후 가교된 폴리아민의 표면에 음이온성 폴리사카라이드 층을 흡착시키는 단계; (c) 임의로 단계 (a) 및 (b)를 1회 이상 반복하는 단계; 및 (d) 음이온성 폴리사카라이드 층, 또는 음이온성 폴리사카라이드의 최외층에, 유리 1차 아미노기를 제공하는 비가교된 폴리아민의 층을 흡착시키는 단계. 후속 단계에서, 유리 1차 아미노기와 반응성인 작용기를 운반하는 생물학적 활성인 화학 실체는 비가교된 폴리아민, 예컨대 헤파린에 결합될 수 있다.

[0013] 그러나 헤파린과 같은 항응고제 실체를 포함하는 개선된 표면 코팅, 특히 항응고제 실체의 생물학적 활성이 유지되거나 향상되는 코팅에 대한 요구가 남아있다. 이러한 개선된 표면 코팅은 항응고제 표면의 이점을 얻을 수 있는 의료 장치 및 기타 물품에서 잠재적인 유용성이 있다.

[0014] 본 발명자들은 놀랍게도, 항응고제 실체가 고정되는 표면의 성질이 코팅의 특징, 특히 항응고제 실체의 결과적인 생물학적 활성에 유의한 영향을 미칠 수 있음을 발견하였다. 특히, 항응고제 실체가 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 고체 물체의 표면에 고정될 때, 음이온성 중합체 층(들)의 적용 조건 및 성질을 주의 깊게 조절하여 예를 들어, 그것이 가질 수 있는 혈전저항 성질을 포함하는 고체 물체의 코팅의 결과적인 특징을 개선할 수 있다.

발명의 내용

[0015] **발명의 요약**

[0016] 한 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층이 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법을 제공한다:

[0017] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0018] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0019] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0020] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

[0021] v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계;

[0022] 여기서,

[0023] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며;

[0024] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0025] 추가의 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층이 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법을 제공한다:

[0026] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0027] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0028] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0029] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

[0030] v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계;

[0031] 여기서,

[0032] 음이온성 중합체는 $-SO_3^-$ 기를 포함하는 중합체이고,

[0033] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) 음이온성 중합체의 10 중량% 내지 25 중량%의 황 함량을 갖는 것을 특징으로 하며;

[0034] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0035] 추가의 양상에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층이 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법을 제공한다:

[0036] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0037] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0038] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0039] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

[0040] v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계;

[0041] 여기서

[0042] 음이온성 중합체는 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하며; 음이온성 중합체는 덱스트란 설페이트이고;

[0043] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1: 단일 이중 층을 갖는 본 발명의 예시적인 코팅을 나타낸다;

도 2: 0.25 M 및 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 정규화된 헤파린 활성(HA)을 나타낸다;

도 3: 상이한 농도에서 상이한 염을 사용한 덱스트란 설페이트 5로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 정규화된 헤파린 활성(HA)을 나타낸다;

도 4: 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 3, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 헤파린 농도(HC)를

나타낸다;

도 5: 다양한 NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 3, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 헤파린 농도(HC)를 나타낸다.

도 6: 상이한 농도에서 상이한 염을 사용한 덱스트란 설페이트 5로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 헤파린 농도(HC)를 나타낸다;

도 7: 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 3, 4 및 5로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 제타 전위를 나타낸다;

도 8: 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 3, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 제타 전위를 나타낸다;

도 9: 0.25 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 3, 4 및 5로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 제타 전위를 나타낸다;

도 10: 0.25 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 3, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 제타 전위를 나타낸다.

도 11: 다양한 NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 제타 전위를 나타낸다.

도 12: 다양한 Na_2HPO_4 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 제타 전위를 나타낸다.

도 13: 다양한 Na_2SO_4 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 제타 전위를 나타낸다.

도 14: 0.25 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 2, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 보존된 혈소판(%)을 나타낸다.

도 15: 0.25 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 2, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 F1 + 2(프로트롬빈 단편)를 나타낸다.

도 16: 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 보존된 혈소판(%)을 나타낸다.

도 17: 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 F1 + 2(프로트롬빈 단편)를 나타낸다.

도 18: 온도 및 습도 시험 전후의 0.25 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 보존된 혈소판(%)을 나타낸다;

도 19: 온도 및 습도 시험 전후의 0.25 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 F1 + 2(프로트롬빈 단편)을 나타낸다;

도 20: 온도 및 습도 시험 전후의 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4, 5 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 보존된 혈소판(%)을 나타낸다;

도 21: 온도 및 습도 시험 전후의 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4, 5 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 F1 + 2(프로트롬빈 단편)를 나타낸다;

도 22: 본 발명의 고체 물체의 전형적인 제타 전위 프로파일을 나타낸다.

도 23: 헤파린의 활성 펜타사카라이드 서열을 나타낸다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] **발명의 상세한 설명**

[0046] **고체 물체**

[0047] 임의의 고체 물체가 잠재적으로 본 발명의 방법을 사용하여 코팅될 수 있지만, 이러한 코팅 및 방법은 의료 장치, 분석 장치, 분리 장치 및 막을 포함하는 기타 산업 물품에 특히 유용하다.

[0048] 고체 물체는 혈전저항성 표면을 가질 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 혈전저항성 표면은 항응고제 실체의 고정화에 의한 응고 반응의 직접적인 약리학적 억제를 나타낼 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 혈전저항성 표면은 혈액과 접촉할 때 임의의 감지할 수 있는 임상적으로 유의한 유해 반응 예컨대 혈전증, 용혈, 혈소판, 백혈구, 및 보체 활성화, 및/또는 다른 혈액 관련 유해 사례를 야기하지 않는다.

[0049] 당업계에서, 용어 "혈액적합성(hemocompatible)", "비혈전성(non-thrombogenic)", "항혈전성(anti-thrombogenic)" 등은 전형적으로 용어 "혈전저항성"과 동등한 것으로 해석될 수 있다.

[0050] 한 실시양태에서, 고체 물체는 의료 장치이다. 고체 물체가 의료 장치인 경우, 이것은 적절하게는 혈전저항성 의료 장치이다. 따라서, 한 실시양태에서 고체 물체는 혈전저항성 의료 장치이다. 본 특허 출원의 목적을 위해, 용어 "의료 장치"는 체내 또는 최외 장치를 의미하지만 더 일반적으로 체내 의료 장치이다.

[0051] 체내 의료 장치는 해부학에서 예컨대 맥관구조 또는 다른 신체 내강, 공간 또는 체강에서, 전형적으로 치료 효과를 제공하기 위해 사용되는 장치이다. 체내 장치는 장기간 또는 일시적으로 사용할 수 있다. 장기간 사용하는 장치는 즉각적인 수술 절차 후 해부학에서 부분적으로 또는 전체적으로 남아 있어 이들을 예컨대 스텐트 또는 스텐트 이식편으로 전달한다. 일시적 또는 단기 사용을 위한 장치에는 의료용 풍선과 같이 치료 영역에 일시적으로 삽입되는 장치(즉, 동일한 수술 절차에서 삽입된 후 제거됨)가 포함된다. 한 실시양태에서, 고체 물체는 체내 의료 장치이다.

[0052] 영구 또는 일시적 체내 의료 장치일 수 있는 체내 의료 장치의 예에는 분기 스텐트, 풍선 확장형 스텐트, 자가확장 스텐트, 신경혈관 스텐트 및 혈류 변환 스텐트(flow diverting stent)를 포함하는 스텐트, 분기 스텐트 이식편을 포함하는 스텐트 이식편, 혈관 이식편 및 분기 이식편을 포함하는 이식편, 중재적 진단 및 치료용 시스와 같은 철회식 시스를 포함하는 시스, 크고 표준 보어가 있는 혈관 내 전달 시스, 지혈 제어가 있거나 없으며 스티어링이 있거나 없는 동맥 도입기 시스, 마이크로 도입기 시스, 투석 접근 시스, 가이딩 시스, 및 경피 시스, 확장기, 폐색기 예컨대 혈관 폐색기, 색전 필터, 색전적제 장치, 카테터, 인공 혈관, 혈액 유치 모니터링 장치, 인공 심장 판막을 포함하는 판막, 심박 조율기 전극, 가이드와이어, 심장 리드, 심폐 우회 회로, 캐뉼라, 플러그, 약물 전달 장치, 풍선, 조직 패치 장치, 혈액 펌프, 패치, 만성 주입 라인 또는 동맥 라인과 같은 라인, 배치 와이어, 지주막하 지속 주입을 위한 장치, 공급 튜브, CNS 션트 예컨대 뇌실흉강 션트(ventriculopleural shunt), 뇌실심방(VA: ventriculoatrial) 션트, 뇌실복강(VP: ventriculoperitoneal) 션트, 심실 심방 션트, 문맥전신 션트 및 복수용 션트를 포함한다.

[0053] 카테터의 예로는 이것으로 제한되는 것은 아니지만, 마이크로카테터, 중심 정맥 카테터, 말초 정맥내 카테터, 혈액투석 카테터, 이식형 정맥 카테터(implantable venous catheter)를 포함하는 코팅된 카테터와 같은 카테터, 터널식 정맥 카테터, 심장 또는 말초 정맥 및 동맥에서의 혈관조영술, 혈관성형술, 또는 초음파 절차에 유용한 관상 카테터, 분광 또는 이미징 기능이 포함된 카테터, 간동맥 주입 카테터, CVC(중심 정맥 카테터), 말초 정맥내 카테터, 말초적으로 삽입된 중심 정맥 카테터(PIC 라인), 유동 지향 풍선 선단 폐동맥 카테터(flow-directed balloon tipped pulmonary artery catheter), 완전 비경구 영양 카테터, 만성 유치 카테터(예컨대 만성 유치 위장 카테터 및 만성 유치 비뇨생식기 카테터), 복막 투석 카테터, CPB 카테터(심폐 우회), 요도 카테터 및 마이크로카테터(예컨대 두개 내 적용을 위해)를 포함한다.

[0054] 한 실시양태에서, 고체 물체는 스텐트, 스텐트 이식편, 시스, 확장기, 폐색기, 판막, 색전 필터, 색전적제 장치, 카테터, 인공 혈관, 혈액 유치 모니터링 장치, 판막, 심박 조율기 전극, 가이드와이어, 심장 리드, 심폐 우회 회로, 캐뉼라, 플러그, 약물 전달 장치, 풍선, 조직 패치 장치, 혈액 펌프, 패치, 라인, 배치 와이어, 지주막하 지속 주입을 위한 장치, 공급 튜브 및 션트로 이루어진 군으로부터 선택된 체내 의료 장치이다. 특정 실시양태에서, 고체 물체는 스텐트 또는 스텐트 이식편이다.

[0055] 한 실시양태에서, 상기 체내 의료 장치는 신경학, 말초, 심장, 정형외과, 피부 또는 부인과 적용에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 스텐트는 심장, 말초 또는 신경학 적용에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 스텐트 이식편은 심장, 말초 또는 신경학 적용에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 시스는 경동맥, 신장, 경요골(transradial), 경중격, 소아 또는 마이크로 적용에 사용될 수 있다.

[0056] 체외 의료 장치의 예로는 혈액 처리 장치, 및 수혈 장치이다. 한 실시양태에서, 상기 체내 의료 장치는 신경학, 말초, 심장, 정형외과, 피부, 또는 부인과 적용에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서 체외 의료 장치는 산소 공급기이다. 다른 실시양태에서 체외 의료 장치는 바이러스, 박테리아, 패혈증을 유발하는 전염증성 사이토카인 및 독소를 제거할 수 있는 필터이다.

[0057] 막은 예를 들어, 혈액투석 막일 수 있다.

[0058] 분석 장치는 예를 들어 크로마토그래피 또는 면역학적 어세이, 반응 화학 또는 촉매와 같은 분석 공정을 수행하기 위한 고체 지지체일 수 있다. 이러한 장치의 예는 슬라이드, 비드, 웰 플레이트 및 막을 포함한다.

[0059] 분리 장치는 예를 들어, 단백질 정제, 친화성 크로마토그래피 또는 이온 교환과 같은 분리 공정을 수행하기 위한 고체 지지체일 수 있다. 이러한 장치의 예로는 필터 및 컬럼을 포함한다.

[0060] 고체 물체는 특히 금속, 합성 또는 자연 발생 유기 또는 무기 중합체, 세라믹 물질, 단백질 기재 물질, 또는 폴리사카라이드계 물질을 포함할 수 있거나 이것으로 형성될 수 있다.

[0061] 적합한 금속은 이것으로 제한되는 것은 아니지만, 생체적합성 금속 예컨대 티타늄, 스테인리스 강, 고 질소 스테인리스 강, 코발트, 크롬, 니켈, 탄탈륨, 니오븀, 금, 은, 로듐, 아연, 백금, 루비듐, 구리 및 마그네슘, 및 이의 조합(합금)을 포함한다. 적절한 합금은 코발트-크롬 합금, 예컨대 L-605, MP35N, 엘질로이(Elgiloy), 니켈-티타늄 합금(예컨대 니티놀(Nitinol))을 포함하는 티타늄 합금, 탄탈륨 합금, 니오븀 합금(예컨대 Nb-1% Zr) 등을 포함한다.

[0062] 한 실시양태에서, 상기 생체적합성 금속은 니티놀과 같은 니켈-티타늄 합금이다.

[0063] 합성 또는 자연 발생 유기 또는 무기 중합체는 폴리올레핀, 폴리에스테르(예컨대 폴리에틸렌 테레프탈레이트 및 폴리부틸렌 테레프탈레이트), 폴리에스테르 에테르, 폴리에스테르 엘라스토머 공중합체(예컨대 HYTREL.RTM의 상품명으로 델라웨어주 윌밍턴 소재의 듀퐁에서 입수 가능한 것들), 플루오르 함유 중합체, 염소 함유 중합체(예컨대 폴리비닐 클로라이드(PVC)), 블록 공중합체 엘라스토머(예컨대 스티렌 엔드 블록, 및 부타디엔, 이소프렌, 에틸렌/부틸렌, 에틸렌/프로펜으로부터 형성된 미드블록을 갖는 공중합체 엘라스토머), 블록 공중합체(예컨대 아크릴로니트릴-스티렌 및 아크릴로니트릴-부타디엔-스티렌 블록 공중합체와 같은 스티렌 블록 공중합체, 또는 블록 공중합체가 폴리에스테르 또는 폴리아미드의 경질 세그먼트 및 폴리에테르의 연질 세그먼트로 구성된 특정 블록 공중합체 열가소성 엘라스토머인 블록 공중합체), 폴리우레탄, 폴리아미드(예컨대 나일론 12, 나일론 11, 나일론 9, 나일론 6/9 및 나일론 6/6), 폴리에테르 블록 아미드(예컨대 PEBAX®), 폴리에테르에스테르아미드, 폴리이미드, 폴리카르보네이트, 폴리페닐렌 설피드, 폴리페닐렌 옥시드, 폴리에테르, 실리콘, 폴리카르보네이트, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 고무, 실리콘 고무, 폴리히드록시산, 폴리알릴아민, 폴리알릴알코올, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴산, 폴리스티렌, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리(메틸)메타크릴레이트, 폴리아크릴로니트릴, 폴리(비닐아세테이트), 폴리(비닐 알코올), 폴리옥시메틸렌, 폴리카르보네이트, 페놀수지, 아미노 에폭시 수지, 셀룰로오스계 플라스틱 및 고무 유사 플라스틱, 생체 흡수성 물질(예컨대 폴리(D,L-락타이드) 및 폴리글리콜리드, 및 이의 공중합체 및 이의 공중합체), 이의 유도체 및 이의 혼합물을 포함한다. 이러한 물질의 조합은 교차 결합의 유무와 관계없이 사용될 수 있다. 이러한 부류 중 일부는 열경화성 및 열가소성 중합체로 둘 모두 구입 가능하다. 본원에서 사용되는 바의 용어 "공중합체"는 2종 이상의 단량체, 예컨대 2, 3, 4, 5종 등에서 형성되는 임의의 중합체를 의미한다.

[0064] 플루오르화 중합체(플루오르 함유 중합체)는 플루오로중합체 예컨대 발포 폴리테트라플루오로에틸렌(ePTFE), 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 플루오르화 에틸렌-프로필렌(FEP), 퍼플루오로카본 공중합체(예컨대 테트라플루오로에틸렌 퍼플루오로알킬비닐 에테르(TFE/PAVE) 공중합체 및 테트라플루오로에틸렌(TFE)과 퍼플루오로메틸 비닐 에테르(PMVE)의 공중합체), 및 중합체 사슬 사이에 가교가 있거나 없는 상기의 조합을 포함한다.

[0065] 한 실시양태에서, 고체 물체는 폴리에테르-블록-아미드, 예컨대 PEBAX®를 포함한다. 다른 실시양태에서, 고체 물체는 염소 함유 중합체(예컨대 PVC) 또는 플루오르 함유 중합체(예컨대 ePTFE)를 포함한다.

[0066] 중합체 기재는 임의로 충전제 및/또는 착색제와 블렌딩될 수 있다. 따라서, 적절한 기재는 착색 물질 예컨대 착색 중합체 물질을 포함한다.

[0067] 세라믹 기재는 이것으로 제한되는 것은 아니지만 실리콘 산화물, 알루미늄 산화물, 알루미나, 실리카, 히드록시아파피타이트, 유리, 칼슘 산화물, 폴리실라놀 및 인 산화물을 포함할 수 있다.

[0068] 단백질계 물질은 실크와 울을 포함한다. 폴리사카라이드계 물질은 아가로스 및 알기네이트를 포함한다.

[0069] **항응고제 실체(Anticoagulant entity)**

[0070] 항응고제 실체는 응고 또는 혈전 형성을 예방하거나 완화하기 위해 포유동물 혈액과 상호 작용할 수 있는 실체이다.

[0071] 항응고제 실체는 헤파린 모이어티, 데르마탄 설페이트 모이어티, 데르마탄 디설페이트 모이어티, 히루딘, 엡티피바티드, 티로피브란, 유로키나제, D-Phe-Pro-Arg 클로로메틸케톤, RGD 펩티드 함유 화합물, AZX100(HSP20을 모방한 세포 펩티드, Capstone Therapeutics Corp., 미국), 혈소판 수용체 안타고니스트, 항트롬빈 항체, 항혈

소판 수용체 항체, 아스피린, 프로스타글란딘 억제제, 혈소판 억제제(예컨대 클로피도그렐, 산화질소(NO), 프로스타글란딘 및 압식시맙(abciximab)), 항혈소판 펩티드, 쿠마딘(즉 4-히드록시쿠마린 부류의 비타민 K 안타고니스트 예컨대 와파린), 아르가트로반(argatroban), 트롬보모듈린, 항응고제 단백질, 항응고제 효소(예컨대 아피라아제)를 포함한다. 한 실시양태에서, 항응고제 실체는 헤파린 모이어티, 데르마탄 설페이트 모이어티 및 데르마탄 디설페이트 모이어티로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0072] 한 실시양태에서, 항응고제 실체는 글리코사미노글리칸이다. 한 실시양태에서, 항응고제 실체는 트롬빈 억제제이다.

[0073] 용어 "헤파린 모이어티"는 헤파린 분자, 헤파린 분자의 단편, 헤파린 분자의 유도체 또는 헤파린 분자의 유사체를 의미한다.

[0074] 한 실시양태에서, 항응고제 실체는 헤파린 모이어티이다. 적절하게는 헤파린 모이어티는 전장 헤파린(천연 헤파린), 헤파린의 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염(예컨대 나트륨 헤파린(예컨대 헵살(Hepsal) 또는 풀라린(Pularin)), 칼륨 헤파린(예컨대 클라린(Clarin)), 리튬 헤파린, 칼슘 헤파린(예컨대 칼시파린(Calciparine) 또는 마그네슘 헤파린(예컨대 쿠테파린(Cutheparine)), 저분자량 헤파린(예컨대 아르데파린 나트륨, 틴자파린 또는 달테파린), 헤파란 설페이트, 헤파리노이드, 헤파린계 화합물, 소수성 카운터 이온을 갖는 헤파린, 인자 Xa의 항트롬빈 매개 억제가 가능한 합성 헤파린 조성물(예컨대 "폰다파리눅스(fondaparinux)" 조성물(예컨대 GlaxoSmithKline 제조의 아릭스트라(Arixtra)) 및 적어도 헤파린으로부터의 활성 펜타사카라이드 서열을 포함하는 합성 헤파린 유도체(예를 들어 문헌[Petitou et al., Biochimie, 2003, 85(1-2):83-9] 참조)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 헤파린 모이어티는 예컨대 온화한 아질산 분해(US4,613,665A, 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨) 또는 과요오드산염 산화(US6,653,457B1, 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨) 및 헤파린 모이어티의 활성이 보존되는 당업계에 공지된 다른 개질 반응에 의해 개질되는 헤파린을 포함한다. 헤파린 모이어티는 또한 하기에서 기재는 바의 링커 또는 스페이서에 결합된 그러한 모이어티도 포함한다. 한 실시양태에서, 헤파린 모이어티는 전장 헤파린이다.

[0075] 저분자량 헤파린은 예를 들어 산화적 해중합, 효소 분해 또는 탈아민화 절단에 의해 제조될 수 있다.

[0076] 한 실시양태에서 헤파린 모이어티는 헤파린의 단편이다. 헤파린의 단편은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 적절하게는 단편은 천연 헤파린을 분해(예컨대, 단편화)하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된 천연 헤파린의 단편이다. 하기 실시예 2e에서 예시된 바와 같이, 헤파린의 단편은 천연 헤파린을 부분적인 아질산 절단 후, 임의로 겔 크로마토그래피에 의해 분별하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 헤파린의 단편은 합성적으로 제조될 수 있다. 합성 제조에는 화학 효소 및/또는 전통적인 유기 화학 방법이 포함될 수 있다.

[0077] 헤파린의 항응고 활성은 주로 항트롬빈(AT) 결합 펜타사카라이드 서열('활성 펜타사카라이드 서열' 또는 '활성 서열'; 도 23 참조)에 의존한다. 적절하게는 헤파린의 단편은 활성 펜타사카라이드 서열을 함유한다.

[0078] 헤파린의 단편은 예를 들어, 5-30, 예컨대 5-20, 예컨대 5-18, 예컨대 5-17, 예컨대 5-10, 예컨대 6-10 사카라이드 잔기의 길이를 가질 수 있다. 대안적으로, 헤파린의 단편은 예를 들어, 6-30, 예컨대 6-20, 예컨대 6-18, 예컨대 6-17 사카라이드 잔기의 길이를 가질 수 있다.

[0079] US6,461,665B1(Scholander; 본원에 참조로 포함됨)은 고정화 전에 헤파린을 처리함으로써 표면 고정화된 헤파린의 항혈전 활성을 개선하는 것을 개시한다. 개선은 상승된 온도 또는 상승된 pH에서 헤파린을 처리하거나, 또는 헤파린을 아민, 알코올, 티올 또는 고정화된 아미노, 히드록실 또는 티올기와 같은 친핵성 촉매와 접촉시킴으로써 달성된다.

[0080] 항응고제 실체는 고체 물체의 표면에 공유적으로 고정되어 있으므로 고체 물체로부터 실질적으로 용출되거나 침출되지 않는다. 하기에서 논의되는 바와 같이, 항응고제 실체는 다양한 방법으로 공유적으로 고정될 수 있다.

[0081] 항응고제 실체는 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합된다.

[0082] 항응고제 실체는 적절하게는 특히 항응고제 실체가 헤파린 모이어티인 경우 양이온성 중합체에 결합된 종점(end-point)이다. 따라서, 한 실시양태에서, 항응고제 실체는 종점 결합된 항응고제 모이어티이다. 특정 실시양태에서, 항응고제 실체는 종점 결합 헤파린 모이어티이다. 해당되는 경우, 항응고제 실체는 바람직하게는 이의 환원 단부를 통해 연결된다. 따라서, 한 실시양태에서, 항응고제 실체는 이의 환원 단부를 통해 연결된다. 특정 실시양태에서, 항응고제 실체는 이의 환원 단부(때때로 환원 말단의 위치 C1으로 지칭됨)를 통해 연결된 종점 결합 헤파린 모이어티이다. 종점 결합, 특히 환원적 종점 결합의 장점은 항응고제 실체(예를 들어 헤파린 모이

어티)의 생물학적 활성이 예컨대 항응고제 실체(예컨대 헤파린 모이어티)의 다른 곳에서의 결합과 비교시 항트롬빈 상호작용 부위의 향상된 이용가능성으로 인해 최대화된다.

[0083] 대표적인 종점 결합 공정은 1차 아미노기를 함유하는 상이한 유형의 기재에 올리고머 또는 중합체 유기 물질이 공유 결합하는 공정을 개시하는 EP0086186B1 (Larm; 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어있다. 헤파린일 수 있는 커플링되는 물질은 디아조화에 의해 분해되어 유리 말단 알데히드기를 갖는 물질 단편을 형성한다. 그 후 물질 단편은 이의 알데히드기를 통해 기재의 아미노기와 반응하여 쉬프 염기를 형성한 다음 (환원을 통해) 2차 아민으로 전환된다. 헤파린의 종점 결합, 특히 환원적 종점 결합의 장점(상기 EP0086186B1에 기재됨)은 헤파린 모이어티의 생물학적 활성이 헤파린 모이어티의 다른 곳에서의 결합과 비교시 항트롬빈 상호작용 부위의 향상된 이용가능성으로 인해 최대화된다.

[0084] 항응고제 실체는 링커를 통해 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 항응고제 실체는 링커를 통해 공유 결합된다.

[0085] 한 실시양태에서, 링커는 2차 아민을 포함한다. 2차 아민을 통해 헤파린 모이어티를 중합체에 공유 결합시키는 대표적인 절차는 EP0086186B1에 기재되어 있다.

[0086] 한 실시양태에서, 링커는 2차 아미드를 포함한다. N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP) 또는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)를 포함하는 아미드화 반응을 통해 헤파린 모이어티가 중합체에 공유 결합하는 대표적인 절차가 WO2012/123384A1(이의 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 명시되어있다.

[0087] 한 실시양태에서, 링커는 1,2,3-트리아졸을 포함한다. 1,2,3-트리아졸 연결을 통해 헤파린 모이어티를 중합체에 공유 결합시키는 대표적인 절차는 WO2010/029189A2(Carmeda AB, 이의 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다. 이 문서는 폴리이민의 아지드- 또는 알킨- 기능화; 알킨- 및 아지드- 기능화된 헤파린(천연 및 아질산 분해된 헤파린 둘 모두)의 제조; 및 1,2,3-트리아졸 링커를 통해 유도체화된 헤파린을 유도체화된 중합체에 연결시키는 반응을 기재한다.

[0088] 한 실시양태에서, 링커는 티오에테르를 포함한다. 티오에테르 결합을 통해 헤파린 모이어티를 중합체에 공유 결합시키는 대표적인 절차는 WO2011/110684A1에 기재되어있다(Carmeda AB et al., 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0089] **양이온성 중합체**

[0090] 양이온성 중합체는 직쇄 중합체일 수 있지만 보다 일반적으로 과분지형 중합체와 같은 분지쇄 중합체이다. 한 실시양태에서 양이온성 중합체는 분지형 양이온성 중합체이다. 양이온성 중합체는 임의로 가교된다. 한 실시양태에서, 양이온성 중합체는 1차/2차 아민기를 포함한다. 한 실시양태에서, 양이온성 중합체는 임의로 가교된 폴리아민이다. 양이온성 중합체(예컨대 폴리아민)는 적절하게는 5 kDa-2,000 kDa, 5 kDa-1,500 kDa, 5 kDa-1,000 kDa, 5 kDa-800 kDa, 5 kDa-500 kDa, 5 kDa-300 kDa 또는 5 kDa-200 kDa 또는 800 kDa-3,000 kDa와 같은 5 kDa-3,000 kDa의 분자량을 갖는다. 양이온성 중합체(예컨대 폴리아민)이 가교되는 경우, 크로톤알데히드 및/또는 글루타르알데히드와 같은 알데히드 가교 링커를 사용하여 적절하게 가교된다. 한 실시양태에서, 양이온성 중합체는 폴리알킬렌이민 예컨대 폴리에틸렌이민이다.

[0091] 양이온성 중합체는 양이온성 중합체 및 음이온성 중합체의 층-층 코팅의 일부를 형성하며, 이는 고체 물체의 표면을 양이온성 및 음이온성 중합체 층으로 교대로 처리함으로써 형성된다. 이중 층은 본원에서 양이온성 중합체 및 음이온성 중합체의 한 층으로 정의된다. 층-층 코팅에서, 양이온성 중합체는 전형적으로 음이온성 중합체 앞에 적용된다, 즉, 고체 물체의 표면은 전형적으로 양이온성 중합체의 제1 층으로 먼저 처리(청구항 1의 단계 i))되고, 그 위에 음이온성 중합체의 제1 층이 적용(청구항 1에서 단계 ii))된다. 필요한 이중 층의 수에 따라, 양이온성 중합체 및 음이온성 중합체의 추가 층이 적용(청구항 1의 단계 iii))될 수 있다. 양이온성 및 음이온성 중합체의 최종(또한 첫 번째이어도 무방함) 이중 층이 완료되면, 양이온성 중합체 층이 그 후 적용(청구항 1의 단계 iv)에 해당함)된다. 양이온성 중합체의 이러한 층(즉, 최외층)은 항응고제 실체로 처리되어 항응고제 실체가 양이온성 중합체의 층에 공유 결합된다. 따라서, 양이온성 중합체의 외부 코팅층은 항응고제 실체를 "포함한다"라고 말할 수 있다. 층-층 코팅에서, 최 내층은 양이온성 중합체 층이고 최외층은 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체의 외부 코팅층이다(도 1 참조).

[0092] 한 실시양태에서, 단계 i)의 양이온성 중합체는 임의로 가교된 폴리아민이다. 한 실시양태에서, 단계 iv)의 양이온성 중합체는 임의로 가교된 폴리아민이다. 한 실시양태에서, 단계 i)의 양이온성 중합체는 단계 iv)의 양이

온성 중합체와 동일하다.

[0093] WO2012/123384A1(Gore Enterprise Holdings, Inc. 등, 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)은 항응고제 실체, 특히 헤파린을 보유하는 복수의 과분지형 중합체 분자를 포함하는 코팅을 갖는 장치를 개시한다. 이러한 과분지형 중합체 분자는 양이온성 중합체의 최외층에서 이용될 수 있다, 즉, 이러한 과분지형 중합체는 단계 iv)의 양이온성 중합체로 사용될 수 있고, 이어서 단계 v)에서 항응고제 실체를 보유하도록 개질될 수 있다.

[0094] **음이온성 중합체**

[0095] 본 발명에 적합한 음이온성 중합체는 -COOH, $-SO_3H$ 및 $-PO_3H_2$로 이루어진 군으로부터 탈양성자화된 작용기를 수반한다. 따라서, 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 $-CO_2^-$, $-SO_3^-$, $-PO_3H^-$ 및 $-PO_3^{2-}$로부터 선택된 기를 포함하는 중합체이다. 적절하게는, 음이온성 중합체는 $-SO_3^-$ 기를 포함하는 중합체이다. 더 적절하게는, 음이온성 중합체에 의해 수반되는 탈양성자화된 작용기는 $-SO_3^-$기로 구성된다.

[0096] 음이온성 중합체는 적절하게는 음이온성 글리코사미노글리칸 또는 폴리사카라이드이다. 중합체의 음이온 특징은 전형적으로 중합체 사슬을 따라 카르복실레이트 또는 설페이트 기에서 유래한다. 따라서, 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 카르복실레이트 및/또는 설페이트기를 보유하는 글리코사미노글리칸 또는 폴리사카라이드, 특히 카르복실레이트 및/또는 설페이트기를 보유하는 글리코사미노글리칸이다. 음이온성 중합체는 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 한 실시양태에서, 음이온성 중합체 및 항응고제 실체는 동일하지 않다.

[0097] 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 임의로 가교된다.

[0098] 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 덱스트란 설페이트, 히알루론산, 폴리(2-아크릴아미도-2-메틸-1-프로판설폰산), 폴리(2-아크릴아미도-2-메틸-1-프로판설폰산-코-아크릴로니트릴)아크릴로니트릴, 폴리(아크릴산), 폴리아네톨설폰산, 폴리(나트륨 4-스티렌설포네이트), 폴리(4-스티렌설폰산-코-말레산), 폴리(비닐 설페이트), 폴리비닐설폰산 및 이의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 적절하게는, 음이온성 중합체는 덱스트란 설페이트이다.

[0099] 덱스트란 설페이트는 무수글루코오스의 설페이트화된 중합체이다. 설페이션의 정도와 결과적으로 덱스트란 셀페이트의 황 함량은 달라질 수 있다.

[0100] 일부 실시양태에서 황 함량은 10 중량% 내지 25 중량%이며, 예컨대 황 함량은 15 중량% 내지 20 중량%이다.

[0101] 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 총 분자량이 750 kDa-10,000 kDa, 예컨대 1,000 kDa-10,000 kDa인 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 총분자량이 650 kDa-1,000 kDa, 예컨대 750 kDa-1,000 kDa인 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 총 분자량이 1,000 kDa-4,500 kDa, 예컨대 2,000 kDa-4,500 kDa인 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 총 분자량이 4,500 kDa-7,000 kDa인 것을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 총 분자량이 7,000 kDa-10,000 kDa인 것을 특징으로 한다. 적절하게는, 음이온성 중합체의 총 분자량은 평가 방법 G에 따라 측정된다.

[0102] 한 실시양태에서, 음이온성 중합체는 용액 전하 밀도가 > 4 μeq/g 내지 7 μeq/g, 예컨대> 5 μeq/g 내지 7 μeq/g인 것을 특징으로 한다. 적절하게는, 음이온성 중합체의 용액 전하 밀도는 평가 방법 H에 따라 측정된다.

[0103] **양이온성 및 음이온성 중합체의 코팅 이중 층(들)**

[0104] 본 발명의 방법은 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체를 형성하는 것을 포함한다. 상기에서 설명된 바와 같이, 이중 층은 양이온성 및 음이온성 중합체의 한 층으로서 본원에서 정의된다(도 1 참조).

[0105] 층상 코팅은 1 이상의 코팅 이중 층, 예컨대 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상 또는 10 이상의 코팅 이중 층을 포함한다. 하나 초과의 코팅 이중 층이 적용될 때, 단계 i) 및 ii)가 반복된다, 즉, 단계 iii)은 임의적이 아니다. 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 단계 iii)은 임의적이 아니다. 이 실시양태에서, 단계 iii)은 코팅 이중 층의 필요한 수를 달성하기 위해 필요한 만큼, 예컨대 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회 또는 9 반복된다. 본 발명의 방법의 단계 iii)의 한 실시양태에서, 단계 i) 및 ii)는 1 내지 10 회, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5 또는 6회 반복된다.

[0106] 단계 iii)이 임의적이 아닌 경우(즉, 단계 i) 및 ii)가 1회 이상 반복되는 경우) 각 반복의 정확한 공정 조건은

동일할 필요는 없다(예컨대 단계 ii)의 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계에서 사용된 염 유형 및/또는 농도는 각각의 반복에서 동일할 필요는 없다). 한 실시양태에서, 공정 조건(예컨대, 단계 ii)의 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계에서 사용된 염 유형 및/또는 농도)은 각각의 반복에서 동일하다.

[0107] **공정 단계**

[0108] 본 발명은 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층이 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법을 제공한다:

[0109] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0110] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0111] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0112] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

[0113] v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유결합시키는 단계;

[0114] 여기서,

[0115] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며;

[0116] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0117] 단계 i)-v)는 주어진 순서로 순차적으로 수행되어야 함을 유의하여야 한다. 즉, 각각의 단계 i)-iv)는 암시적으로 "그리고 그 후"가 뒤 따른다. 이는 각각의 명시된 단계 i)-v) 사이에서 수행되는 하나 이상의 추가 단계를 배제하지 않는다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 단계 i)과 단계 ii) 사이, 단계 ii)와 단계 iii) 사이, 단계 iii)과 단계 iv) 사이 또는 단계 iv)와 단계 v) 사이의 단계를 추가로 포함한다.

[0118] 예를 들어, 명시된 공정 단계 사이에서 세척 단계가 수행될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0119] 본 발명자들은 놀랍게도, 단계 ii)의 염 농도(즉, 음이온성 중합체 코팅층 (들)이 적용될 때 존재하는 염 농도)가 고체 물체 코팅의 생성된 특징, 특히 최종 고체 물체의 혈전저항 성질에 영향을 준다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 실시예 2a 및 3a에서 나타낸 바와 같이 단계 ii)가 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행될 때, 고체 물체 코팅의 생성된 특징, 특히 최종 고체 물체의 혈전저항 성질이 개선될 수 있음을 발견하였다.

[0120] 한 실시양태에서, 단계 ii)는 염 농도가 0.25 M-4.0 M, 예컨대 0.25 M-3.0 M, 0.5 M-3.0 M, 1.0 M-3.0 M, 1.5 M-3.0 M, 0.25 M-1.5 M, 0.5 M-1.5 M, 0.75 M-1.5 M 또는 1.0 M-2.0 M에서, 특히, 염 농도가 1.0 M-3.0 M, 예컨대 1.0 M-2.0 M 또는 0.75 M-1.5 M 또는 1.5 M-3.0 M에서 수행된다.

[0121] 한 실시양태에서, 염은 무기염이다. 적절하게는, 염은 나트륨염, 칼륨염, 마그네슘염, 칼슘염, 리튬염, 암모늄염, 바륨염 및 스트론튬 염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0122] 한 실시양태에서, 염은 무기 나트륨염이다.

[0123] 한 실시양태에서, 염은 염화나트륨, 황산나트륨, 인산수소나트륨 및 인산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0124] 한 실시양태에서, 염은 염화나트륨이다.

[0125] 한 실시양태에서, 염은 염화나트륨이 아니다.

[0126] 한 실시양태에서, 염은 농도가 0.25 M-3.0 M, 예컨대 0.5 M-3.0 M, 예컨대 1.0 M-3.0 M, 예컨대 1.5 M-3.0 M인 염화나트륨이다.

[0127] 한 실시양태에서, 염은 농도가 0.25 M-1.5 M, 예컨대 0.5 M-1.5 M, 예컨대 0.75 M-1.5 M인 황산나트륨이다.

[0128] 한 실시양태에서, 염은 농도가 0.25 M-3.0 M, 예컨대 0.5 M-3.0 M, 예컨대 1.0 M-3.0 M, 예컨대 1.0 M-2.0 M인 인산수소나트륨이다.

[0129] 한 실시양태에서, 염은 농도가 0.25 M-3.0 M 예컨대 0.5 M-3.0 M 예컨대 1.0 M-3.0 M. 예컨대 1.0 M-2.0 M인

인산나트륨이다.

[0130] 단계 i)(고체 물체의 표면을 양이온성 중합체로 처리하는 단계)전에 고체 물체의 표면은 임의로 전처리 단계가 수행될 수 있다.

[0131] 전처리 단계는 후속 코팅의 접착 및 표면 커버리지를 개선하기 위한 세정 단계일 수 있다. 적절한 세정제는 알코올과 같은 용매, 알코올과 히드록시드 화합물(예컨대 수산화 나트륨) 수용액의 혼합물을 포함하는 용액과 같은 높은 pH의 용액, 수산화 나트륨 용액 자체, 테트라메틸 암모늄 히드록시드(TMAH)를 함유하는 용액, Piranha(황산과 과산화수소의 혼합물)와 같은 산성 용액, 염기성 Piranha 용액, 및 황산 및 과망간산 칼륨의 조합 또는 상이한 유형의 과산화황산 또는 과산화이황산 용액(또한 암모늄, 나트륨 및 칼륨염으로서)을 포함하는 기타 산화제를 포함하거나, 또는 공기, 아르곤 또는 질소 분위기 또는 이의 조합에서 고체 물체를 플라즈마에 노출시킴에 의한 것이다.

[0132] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 단계 i) 이전에 전처리 단계를 추가로 포함한다. 적절하게는, 전처리 단계는 세정 단계이다.

[0133] 대안적으로, 전처리 단계는 단계 i)-v)를 적용하기 전에 단계 i)-v)에 따라 코팅될 고체 물체의 표면을 중합체 또는 프라이머 코팅층과 같은 물질로 오버레이하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 "예비(preparative)" 코팅층은 예를 들어, 후속 층상 코팅 공정을 최적화하기 위해 원하는 표면 지형 또는 질감을 생성하도록 코팅될 고체 물체의 표면이 "스컬프트"되거나 개질되도록 허용할 수 있다. 추가 코팅층은 또한 후속 층상 코팅의 접착력을 향상시킬 수 있으며, 특히 처리 동안 무결성을 유지하는 데 도움이 될 수 있다. 고체 물체 상의 이러한 프라이밍 코팅층의 예는 화학 기상 증착(CVD)을 사용하여 적용된 코팅층이다. 고체 물체 상의 이러한 프라이밍 코팅층의 또 다른 예는 폴리 도파민 또는 이의 유사체의 코팅이다.

[0134] 한 실시 양태에서, 전처리 단계는 고체 물체의 표면을 폴리올레핀, 폴리이소부틸렌, 에틸렌-α-올레핀 공중합체, 아크릴 중합체, 아크릴 공중합체, 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 메틸에테르, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리비닐리덴 클로라이드, 플루오로중합체(예컨대 발포 폴리테트라플루오로에틸렌(ePTFE), 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 플루오르화 에틸렌-프로필렌(FEP), 퍼플루오로카본 공중합체, 예컨대 테트라플루오로에틸렌 퍼플루오로알킬비닐 에테르(TFE/PAVE) 공중합체, 테트라플루오로에틸렌(TFE)과 퍼플루오로메틸 비닐 에테르(PMVE)의 공중합체, TFE와 미국 특허 제8,658,707호(W.L. Gore and Associates, 이의 전체 및 이의 조합이 본원에서 참조로 포함됨)에서 기재된 바의 아세테이트, 알코올, 아민, 아미드, 설포네이트, 작용기 등을 포함하는 작용성 단량체의 공중합체, 폴리아크릴로니트릴, 폴리비닐 케톤, 폴리스티렌, 폴리비닐 아세테이트, 에틸렌-메틸 메타크릴레이트 공중합체, 아크릴로니트릴-스티렌 공중합체, ABS 수지, 나일론 12, 나일론 12의 블록 공중합체, 폴리카프로락톤, 폴리옥시메틸렌, 폴리에테르, 에폭시 수지, 폴리우레탄, 레이온 트리아세테이트, 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 부티레이트, 셀로판, 셀룰로오스 니트레이트, 셀룰로오스 프로피오네이트, 셀룰로오스 에테르, 카르복시메틸 셀룰로오스, 키틴, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산-폴리에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리비닐 알코올, 엘라스토머 중합체 예컨대 실리콘(예컨대 폴리실록산 또는 치환된 폴리실록산), 폴리우레탄, 열가소성 엘라스토머, 에틸렌 비닐 아세테이트 공중합체, 폴리올레핀 엘라스토머, EPDM 고무, 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 중합체로 처리하는 단계를 포함한다.

[0135] 한 실시양태에서, 본원에서 정의된 바의 단계 i)-v)로 구성된 본원에서 기재된 바의 고체 물체의 제조 방법이 제공된다. 즉, 고체 물체는 단계 i)-v)에서 발생하는 것 이외의 추가 코팅층을 갖지 않는다.

[0136] 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 살균될 수 있다. 적절한 살균 공정은 이것으로 제한되는 것은 아니지만, 에틸렌옥시드, 증기 과산화수소, 플라즈마 상 과산화수소, 건열, 오토클레이브 증기 살균, 이산화염소 살균, 감마선 살균 또는 전자빔 살균을 사용한 살균을 포함한다.

[0137] 실시예 7에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 상승된 온도 및 습도에 노출되었고 이의 혈전저항 성질을 유지하였다. 상승된 온도 및 습도 조건은 엄격한 살균 조건, 특히 에틸렌 옥시드 살균의 모방으로 작용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 살균에 안정할 것으로 예상된다.

[0138] **코팅 성질**

[0139] 전형적으로, 코팅층은 평균 총 두께가 약 10 nm 내지 약 1000 nm, 예컨대 약 10 nm 내지 약 800 nm, 예컨대 약 10 mM 내지 약 500 nm, 약 10 nm 내지 약 400 nm, 약 10 nm 내지 약 300 nm, 약 10 nm 내지 약 200 nm 또는 약 10 nm 내지 약 100 nm일 것이다. 코팅 두께는 깊이 프로파일링이 있는 X 선 광전자 분광법(평가 방법 J 참조)을

사용하거나 소산이 있는 수정 결정 미량저울(Quartz Crystal Microbalance, QCM)(평가 방법 O 참조)을 사용함에 의한 적절한 코팅 두께 분석기 또는 게이지를 사용하여 측정할 수 있다. 적절하게는, 평가 방법 O를 사용하여 코팅 두께를 측정한다.

[0140] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 적절하게 평가 방법 B에 따라 측정된 ATIII의 결합에 대해 적어도 1 pmol/cm^2 표면 예컨대 적어도 2 pmol/cm^2 표면, 적어도 3 pmol/cm^2 표면, 적어도 4 pmol/cm^2 표면, 또는 적어도 5 pmol/cm^2 표면의 항응고제 실체 활성(특히 헤파린 활성)을 갖는다.

[0141] 한 실시양태에서, 고체 물체의 혈전저항성 표면은 적절하게 평가 방법 B에 따라 측정된 ATIII의 결합에 대해 적어도 1 pmol/cm^2 표면 예컨대 적어도 2 pmol/cm^2 표면, 적어도 3 pmol/cm^2 표면, 적어도 4 pmol/cm^2 표면, 또는 적어도 5 pmol/cm^2 표면의 항응고제 실체 활성(특히 헤파린 활성)을 갖는다.

[0142] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 적절하게 평가 방법 M에 따라 측정된 HCII의 결합에 대해 적어도 5 pmol/cm^2 표면 예컨대 적어도 12 pmol/cm^2 표면, 적어도 20 pmol/cm^2 표면, 적어도 50 pmol/cm^2 표면의 항응고제 실체 활성(특히 헤파린 활성)을 갖는다.

[0143] 한 실시양태에서, 고체 물체의 혈전저항성 표면은 적절하게 평가 방법 M에 따라 측정된 HCII의 결합에 대해 적어도 5 pmol/cm^2 표면 예컨대 적어도 12 pmol/cm^2 표면, 적어도 20 pmol/cm^2 표면, 적어도 50 pmol/cm^2 표면의 항응고제 실체 활성(특히 헤파린 활성)을 갖는다.

[0144] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 적절하게 평가 방법 E에 따라 측정된 적어도 80% 보존된 혈소판, 예컨대 적어도 85% 보존된 혈소판, 예컨대 적어도 90% 보존된 혈소판의 혈액 접촉 성능을 갖는다.

[0145] 한 실시양태에서, 고체 물체의 혈전저항성 표면은 적절하게 평가 방법 E에 따라 측정된 적어도 80% 보존된 혈소판, 예컨대 적어도 85% 보존된 혈소판, 예컨대 적어도 90% 보존된 혈소판의 혈액 접촉 성능을 갖는다.

[0146] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 적절하게 평가 방법 F에 따라 측정된 <10,000 pmol/L 예컨대 7,500 pmol/L 미만, 5,000 pmol/L 미만 또는 4,000 pmol/L 미만의 F1+2 값을 갖는다.

[0147] 한 실시양태에서, 고체 물체의 혈전저항성 표면은 적절하게 평가 방법 F에 따라 측정된 <10,000 pmol/L, 7,500 pmol/L 미만, 5,000 pmol/L 미만 또는 4,000 pmol/L 미만의 F1+2 값을 갖는다.

[0148] 한 실시양태에서, 항응고제 실체는 헤파린 모이어티이며, 여기서 고체 물체는 적절하게 평가 방법 A에 따라 측정된 적어도 1 μg/cm^2, 예컨대 적어도 2 μg/cm^2, 적어도 4 μg/cm^2, 적어도 5 μg/cm^2, 또는 적어도 6 μg/cm^2의 헤파린 농도를 갖는다.

[0149] 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 제타 전위 프로파일은 적절하게 평가 방법 D를 사용하여 측정할 수 있다. 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 전형적인 제타 전위 프로파일은 제타 전위 프로파일을 규정하고 정의하는데 사용할 수 있는 다양한 매개변수, 특히 제타 전위가 0mV인 특정 pH 값에 해당하는 등전점(IEP)(1A); 제타 전위(2B)가 최소인 pH(2A)에 해당하는 곡선의 전역 최소값; 및 전역 최소값에서 제타 전위(3A)와 pH 9에서 제타 전위(3B) 간의 차이에 해당하는 델타 값(Δ)을 도 22에 나타낸다.

[0150] 도 7-13(실시예 4a 및 4b)에서 알 수 있는 바와 같이 덱스트란 설페이트 4-7을 사용한 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체에 대해 유사한 제타(ζ) 전위 프로파일이 얻어졌다. 따라서, 제타 전위 프로파일은 적어도 이의 바람직한 양상에서 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 전위 핑거프린트로 볼 수 있다. 이러한 전위 핑거프린트에 따라, 바람직하게는 IEP(1A)가 pH 3 미만이고, 곡선의 전역 최소 값(2A)은 pH 5 미만이고 델타 값, 즉 전역 최소 값에서의 제타 전위(3A)와 pH 9에서의 제타 전위(3B) 간의 차이는 적어도 20mV이다. 이러한 매개 변수는 평가 방법 D에 따라 적절하게 측정된다.

[0151] 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 적절하게는 헤파린의 산성 성질이 코팅된 표면에서 우세하기 때문에 pH 3 미만의 등전점(IEP)을 갖는 제타 전위 프로파일을 갖는다. 대조적으로, 불활성 중합체 물질은 대략 pH 4의 IEP를 가질 것이다. 산성 기를 갖는 샘플의 팽윤 성질은 알칼리 영역 쪽에서 보인다. 팽윤은 벌크 방향으로 전단 면이 힘을 받을 것이고 더 낮은 절대 제타 전위 값(0mV에 가까움)을 얻어야 한다. 제타 전위의 높은 델타 값은 평가 방법 B, M, E 또는 F에 따라 평가할 때 높은 혈전저항 성질과 관련이 있다. 또한, 본 발명의 방법에서

사용된 더 높은 염 농도는 시험된 염에 관계없이 알칼리 영역에서 더 낮은 절대 제타 전위 값을 제공하지만, 여전히 다시 항트롬빈 결합 값과 상관되어 있다. 이론에 제한됨이 없이, 이것은 팽윤을 진행할 수 있는 코팅에서 헤파린 분자에 대한 항트롬빈의 증가된 접근으로 잠재적으로 설명될 수 있다.

[0152] **치료 방법**

[0153] 고체 물체, 특히 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 의료 장치는 의료 요법에서 사용된다.

[0154] 본 발명의 한 양상에서, 인간 또는 동물 신체의 조직을 치료하는 데 사용하기 위해 상기 기재된 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 의료 장치)가 제공된다. 치료될 조직은 임의의 체강, 공간, 또는 중공 기관 통로(들) 예컨대 혈관, 요로, 장관, 비강, 신경 집(neural sheath), 추간 영역, 골강, 식도, 자궁 내 공간, 췌장관 및 담관, 직장, 및 이식된 혈관 이식편, 스텐트, 보철, 또는 기타 유형의 의료용 이식물이 있는 이전에 개재된 신체 공간을 포함한다. 본 발명의 여전히 또 다른 양상에서, 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(예컨대, 의료 장치)는 뇌의 동맥류를 치료하기 위해 배치될 수 있다.

[0155] 본원에 기재된 바의 코팅된 고체 물체(특히 의료 장치)는 혈관으로부터 색전 및 혈전과 같은 방해물 제거에서, 폐색된 신체 통로에 대한 개방성을 복원하기 위한 확장 장치로서, 통로 또는 공간을 막거나 채우는 수단을 선택적으로 전달하기 위한 폐색 장치로서, 및 카테터와 같은 경관 기기(transluminal instrument)의 센터링 메커니즘으로 사용될 수 있다.

[0156] 한 실시양태에서, 인체의 혈관에서 협착 또는 재협착의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 스텐트, 이식편 또는 스텐트 이식편과 같은 의료 장치)가 제공된다. 다른 실시양태에서, 이전에 배치된 용출 구조물이 실패한 경우, 인체의 혈관에서 협착 또는 재협착의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 스텐트, 이식편 또는 스텐트 이식편과 같은 의료 장치)가 제공된다. 다른 실시양태에서, 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 스텐트, 이식편 또는 스텐트 이식편과 같은 의료 장치)는 예컨대 신장 투석 동안 사용되는 것인 동정맥 접근 부위를 확립하거나 유지하기 위해 사용될 수 있다. 추가 실시양태에서, 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 스텐트, 이식편 또는 스텐트 이식편 예컨대 혈관 이식편과 같은 의료 장치)는 막힘 또는 혈관 협착 영역 주변에서 흐름의 방향변경을 위해 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 스텐트, 이식편 또는 스텐트 이식편과 같은 의료 장치)는 병든 혈관 영역의 개방성을 복원하거나 또는 동맥류를 배제하기 위해 배치될 수 있다. 여전히 다른 실시양태에서, 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 스텐트, 이식편 또는 스텐트 이식편과 같은 의료 장치)는 혈관성형술 후 병든 혈관을 강화하기 위해 배치될 수 있다. 여전히 다른 실시양태에서, 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 스텐트, 이식편 또는 스텐트 이식편과 같은 의료 장치)는 풍선 보조 또는 코일 보조 절차를 사용하여 뇌에 배치될 수 있다.

[0157] 한 실시양태에서, 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 의료 장치)는 말초 동맥의 폐색성 질환이 있는 환자의 경피 경관 혈관성형술(PTA: Percutaneous Transluminal Angioplasty)에 사용될 수 있다.

[0158] 본 발명의 또 다른 양상에서, 상기 기재된 바의 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체(특히 의료 장치)를 상기 인체의 혈관에 이식하는 단계를 포함하는 협착 또는 재협착의 예방 또는 치료 방법이 제공된다.

[0159] **본 발명의 추가 실시양태**

[0160] 본 발명의 방법과 관련하여 상기에서 기재된 실시양태 및 선호사항을 하기 실시양태에서 동등하게 적용한다.

[0161] 한 실시양태에서 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층은 양이온성 중합체를 포함하는 층인 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0162] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0163] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0164] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계; 및

[0165] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0166] 여기서,

[0167] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며;

[0168] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0169] 한 실시양태에서, 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 양이온성 중합체를 포함하는 층이고;

[0170] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0171] 한 실시양태에서 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층은 음이온성 중합체를 포함하는 층인 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0172] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0173] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0174] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0175] 여기서,

[0176] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며;

[0177] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0178] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 음이온성 중합체를 포함하는 층이고; 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 한다.

[0179] 한 실시양태에서 하기 단계로 구성되며, 외부 코팅층은 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0180] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0181] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0182] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0183] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

[0184] v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계;

[0185] 여기서

[0186] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며;

[0187] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0188] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체를 포함하는 층이고; 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 한다. 적절하게 음이온성 중합체는 0.25 M-5.0 M, 예컨대 0.25 M-4.0 M 또는 0.25 M-3.0 M의 염 농도에서 표면에 적용된다.

[0189] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체를 포함하는 층이며; 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-1,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 한다. 적절하게 음이온성 중합체는 0.25 M-5.0 M, 예컨대 0.25 M-4.0 M 또는 0.25 M-3.0 M의 염 농도에서 표면에 적용된다.

[0190] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체를 포함하는 층이며; 음이온성 중합체는 (a)

1,000 kDa-4,500 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 한다. 적절하게 음이온성 중합체는 0.25 M-5.0 M, 예컨대 0.25 M-4.0 M 또는 0.25 M-3.0 M의 염 농도에서 표면에 적용된다.

[0191] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체를 포함하는 층이고; 음이온성 중합체는 (a) 4,500 kDa-7,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 한다. 적절하게 음이온성 중합체는 0.25 M-5.0 M, 예컨대 0.25 M-4.0 M 또는 0.25 M-3.0 M의 염 농도에서 표면에 적용된다.

[0192] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체를 포함하는 층이며; 음이온성 중합체는 (a) 7,000 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 한다. 적절하게 음이온성 중합체는 0.25 M-5.0 M, 예컨대 0.25 M-4.0 M 또는 0.25 M-3.0 M의 염 농도에서 표면에 적용된다.

[0193] 한 실시양태에서 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층은 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0194] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0195] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0196] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0197] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

[0198] v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계;

[0199] 여기서,

[0200] 음이온성 중합체는 $-SO_3^-$ 기를 포함하는 중합체이고,

[0201] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) 음이온성 중합체의 10 중량% 내지 25 중량%의 황 함량을 갖는 것을 특징으로 하며;

[0202] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0203] 한 실시양태에서 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층은 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0204] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0205] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0206] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0207] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

[0208] v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계;

[0209] 여기서,

[0210] 음이온성 중합체는 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하며; 음이온성 중합체는 덱스트란 설페이트이고;

[0211] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0212] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체를 포함하는 층이고; 음이온성 중합체는 $-SO_3^-$ 기를 포함하는 중합체이며, 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) 음이온성 중합체의 10 중량% 내지 25 중량%의 황 함량을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0213] 한 실시양태에서 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층은 양이온성 중합체를 포함하는 층인 양이온성 및 음이온성

중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0214] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0215] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0216] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계; 및

[0217] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0218] 여기서,

[0219] 음이온성 중합체는 $-SO_3^-$ 기를 포함하는 중합체이고,

[0220] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) 음이온성 중합체의 10 중량% 내지 25 중량%의 황 함량을 갖는 것을 특징으로 하며;

[0221] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0222] 한 실시양태에서 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층은 양이온성 중합체를 포함하는 층인 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0223] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0224] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0225] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계; 및

[0226] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0227] 여기서,

[0228] 음이온성 중합체는 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하며; 음이온성 중합체는 덱스트란 설페이트이고;

[0229] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0230] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되고, 여기서 외부 코팅층은 양이온성 중합체를 포함하는 층이고; 음이온성 중합체는 $-SO_3^-$ 기를 포함하는 중합체이며, 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) 음이온성 중합체의 10 중량% 내지 25 중량%의 황 함량을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0231] 한 실시양태에서 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층은 음이온성 중합체를 포함하는 층인 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0232] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0233] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0234] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0235] 여기서

[0236] 음이온성 중합체는 $-SO_3^-$ 기를 포함하는 중합체이고,

[0237] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) 음이온성 중합체의 10 중량% 내지 25 중량%의 황 함량을 갖는 것을 특징으로 하며;

[0238] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0239] 한 실시양태에서 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층은 음이온성 중합체를 포함하는 층인 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법이 제공된다:

[0240] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0241] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0242] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0243] 여기서,

[0244] 음이온성 중합체는 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하며; 음이온성 중합체는 덱스트란 설페이트이고;

[0245] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0246] 한 실시양태에서 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체가 제공되며, 여기서 외부 코팅층은 음이온성 중합체를 포함하는 층이고; 음이온성 중합체는 $-SO_3^-$ 기를 포함하는 중합체이며, 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) 음이온성 중합체의 10 중량% 내지 25 중량%의 황 함량을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0247] **발명의 조항**

[0248] 본 발명의 추가 조항:

[0249] 1. 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층이 항응고제 실체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조방법:

[0250] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0251] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0252] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0253] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계; 및

[0254] v) 양이온성 중합체의 최외층을 항응고제 실체로 처리하여, 항응고제 실체를 양이온성 중합체의 최외층에 공유 결합시키는 단계;

[0255] 여기서,

[0256] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며,

[0257] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0258] 2. 조항 1에 있어서, 음이온성 중합체가 덱스트란 설페이트인 고체 물체의 제조 방법.

[0259] 3. 조항 1 또는 조항 2에 있어서, 음이온성 중합체가 750 kDa-10,000 kDa, 예컨대 1,000 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 고체 물체의 제조 방법.

[0260] 4. 조항 1 내지 조항 3 중 어느 한 항에 있어서, 음이온성 중합체가 > 4 μeq/g 내지 7 μeq/g, 예컨대 5 μeq/g 내지 7 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하는 고체 물체의 제조 방법.

[0261] 5. 조항 1 내지 조항 4 중 어느 한 항에 있어서, 단계 ii)가 0.25 M-4.0 M, 예컨대 0.25 M-3.0 M의 염 농도에서 수행되는 고체 물체의 제조 방법.

[0262] 6. 조항 1 내지 조항 5 중 어느 한 항에 있어서, 염이 염화나트륨, 황산나트륨, 인산수소나트륨 및 인산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 특히 염화나트륨인 고체 물체의 제조 방법.

[0263] 7. 조항 1 내지 조항 6 중 어느 한 항에 있어서, 단계 i)의 양이온성 중합체가 임의로 가교된 폴리아민이고/이거나;

[0264] 단계 iv)의 양이온성 중합체가 임의로 가교된 폴리아민인 고체 물체의 제조 방법.

[0265] 8. 조항 1 내지 조항 7 중 어느 한 항에 있어서, 항응고제 실체가 헤파린 모이어티 예컨대 이의 환원 단부를 통해 연결되는 종점 결합 헤파린 모이어티인 고체 물체의 제조 방법.

[0266] 9. 조항 1 내지 조항 8 중 어느 한 항에 있어서, 고체 물체가 혈전저항성 의료 장치인 고체 물체의 제조 방법.

[0267] 10. 외부 코팅층은 항응고제 실체가 공유 결합된 양이온성 중합체를 포함하는 층이며;

[0268] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하는,

[0269] 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체.

[0270] 11. 조항 10에 있어서, 음이온성 중합체가 650 kDa-1,000 kDa, 또는 1,000 kDa-4,500 kDa 또는 4,500 kDa-7,000 kDa 또는 7,000 kDa-10,000 kDa의 총 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 고체 물체.

[0271] 12. 조항 10 또는 조항 11에 있어서, 음이온성 중합체가 0.25 M-5.0 M, 예컨대 0.25 M-4.0 M 또는 0.25 M-3.0 M의 염 농도에서 표면에 적용되는 고체 물체.

[0272] 13. 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층이 양이온성 중합체를 포함하는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법:

[0273] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0274] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0275] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계; 및

[0276] iv) 양이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0277] 여기서,

[0278] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며,

[0279] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0280] 14. 외부 코팅층이 양이온성 중합체를 포함하는 층이고;

[0281] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa-10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하는, 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체.

[0282] 15. 하기 단계를 포함하며, 외부 코팅층이 음이온성 중합체를 포함하는 층인 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅을 포함하는 표면을 갖는 고체 물체의 제조 방법:

[0283] i) 양이온성 중합체로 고체 물체의 표면을 처리하는 단계;

[0284] ii) 음이온성 중합체로 표면을 처리하는 단계;

[0285] iii) 임의로 단계 i) 및 ii)를 1회 이상 반복하는 단계;

[0286] 여기서,

[0287] 음이온성 중합체는 (a) 650 kDa 10,000 kDa의 총 분자량; 및 (b) >4 μeq/g의 용액 전하 밀도를 갖는 것을 특징으로 하며,

[0288] 단계 ii)는 0.25 M-5.0 M의 염 농도에서 수행된다.

[0289] **장점**

[0290] 적어도 일부 실시양태에서 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 하나 이상의 하기 이점 또는 장점이 기대된다:

[0291] · 균일한 분포를 갖고 비교적 평활한 항응고제 실체의 코팅을 예컨대 평가 방법 C(톨루이딘 블루 염색 시험) 또는 평가 방법 I(SEM)를 사용하여 결정된 바와 같이 얻을 수 있다;

[0292] · 예를 들어 제조 물질에 관계없이 장치의 혈전저항 성질을 개선하기 위해 고체 물체의 고유한 성질을 차폐할 균일한 코팅을 얻을 수 있다;

[0293] · 헤파린 활성과 같은 양호한 항응고제 실체 활성을 가진 코팅을 예컨대 평가 방법 B 또는 M을 사용하여 결정된 바와 같이 얻을 수 있다;

[0294] · 공유 결합으로 인해 항응고제 실체 예컨대 헤파린이 침출하지 않으며 이에 따라 긴 수명을 갖는 혈전저항성 코팅을 얻을 수 있다;

[0295] · 살균시(예컨대 EO 사용) 성질이 보존되는 코팅을 얻을 수 있다;

[0296] · 층간에 이온 상호작용의 가역적 형성 가능성으로 인해 자가 치유 코팅을 얻을 수 있다;

[0297] · 양호한 생체 적합성을 갖는 코팅을 예컨대 평가 방법 N을 사용하여 결정되는 바와 같이 얻을 수 있다;

[0298] · 예컨대 평가 방법 E(혈소판) 및/또는 평가 방법 F(혈액 루프)를 사용하여 결정된 바와 같이 항응고제 예컨대 헤파린의 전신 투여 필요성을 감소시킬 수 있으며, 접촉 활성화의 가능성을 감소시킬 수 있는 코팅을 얻을 수 있다;

[0299] · 평가 방법 N을 사용하여 결정된 바와 같이 항염증 성질과 혈전저항성의 조합을 갖는 고체 물체를 얻을 수 있으며, 이는 특정 적용 예컨대 심혈관 적용에서 유익할 수 있다;

[0300] · 생체분자에 대한 양호한 결합능(binding capacity)을 갖는 분석 또는 분리 장치를 얻을 수 있다; 그리고

[0301] · 긴 헤파린 활성 수명을 갖는 분석 또는 분리 장치를 얻을 수 있다.

[0302] 본 발명은 상기에서 인용된 군 및 군의 실시양태의 모든 조합을 포함한다.

[0303] **약어**

[0304]	Ac	아세틸
[0305]	ABS	아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌
[0306]	ATIII	항트롬빈 III
[0307]	CNS	중추 신경계
[0308]	CPB	심폐 우회
[0309]	CVC	중심 정맥 카테터
[0310]	CVD	화학 기상 증착
[0311]	Da	달톤
[0312]	DI	탈이온
[0313]	EDC	1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드
[0314]	EO	에틸렌 옥시드
[0315]	EPDM	에틸렌 프로필렌 디엔 단량체(M 클래스)
[0316]	ePTFE	발포 폴리테트라플루오로에틸렌
[0317]	FEP	플루오르화 에틸렌-프로필렌
[0318]	GPC	겔 투과 크로마토그래피
[0319]	HCII	헤파린 보조인자 II
[0320]	HIT	헤파린 유발 혈소판 감소증
[0321]	IEP	등전점
[0322]	M	몰 농도
[0323]	MBTH	3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존 히드로클로라이드
[0324]	PAVE	퍼플루오로알킬비닐 에테르
[0325]	PES-Na	나트륨 폴리에틸렌 설페이트
[0326]	PTA	경피 경관 혈관성형술

[0327] PIC 말초적으로 삽입된 중심 카테터

[0328] PMVE 퍼플루오로메틸 비닐 에테르

[0329] PTFE 폴리테트라플루오로에틸렌

[0330] PUR 폴리우레탄

[0331] PVC 폴리비닐 클로라이드

[0332] RGD 아르기닐글리실아스파르트 산

[0333] SEM 주사 전자 현미경 검사/현미경

[0334] SPDP N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트

[0335] TFE 테트라플루오로에틸렌

[0336] TMAH 테트라메틸 암모늄 히드록시드

[0337] TMB 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘

[0338] VA 뇌실심방

[0339] VP 뇌실복강

[0340] XPS X 선 광전자 분광법

[0341] **실시예**

[0342] **일반 절차**

[0343] 화학물질

[0344] 이소프로판올, 인산이수소나트륨 이수화물, 황산나트륨 및 염화나트륨은 시그마 알드리치 및 브이더블유알 케미칼즈(VWR Chemicals)로부터 입수 가능하며 받은 그대로 사용할 수 있다. 약전 품질의 헤파린은 본질적으로 EP0086186A1에 기재되고 실시예에서 사용된 바와 같이 아질산으로 처리되었다. 폴리아민은 US9,101,696B2에 기재된 바와 같이 판매회사에서 입수 가능하다. 덱스트란 설페이트는 실시예 1의 표 1에 나타낸 바와 같이 다양한 판매회사로부터 구입하였다. 탈이온(DI)수는 하기 실시예에서 사용하였다.

[0345] 물질

[0346] PVC 튜빙은 플렉스 튜빙 프로덕츠(Flex Tubing Products)에서 구입하였다. PUR 튜빙은 뉴에이지 인더스트리즈(NewAge Industries)에서 구입하였다. 스테인리스 강 쿠폰은 히랩 메카노 에이비(Helab Mekano AB)에서 구입하였다.

[0347] **평가 방법**

[0348] 각각의 방법에 의해 평가되는 매개 변수는 괄호 안에 표시되어 있다.

[0349] 평가 방법 A: 헤파린 농도 시험(정량적 헤파린 결합)

[0350] 표면 고정화된 헤파린의 정량화는 헤파린의 완전한 분해에 이어 용액으로 방출된 반응 생성물의 비색 결정에 의해 수행될 수 있다. 분해는 산성 조건하에 헤파린 표면을 과량의 아질산나트륨과 반응시켜 달성된다. 주로 디사카라이드인 분해 생성물은 이의 전체가 본원에 참조로 포함된 문헌[Smith R.L. and Gilkerson E (1979), Anal Biochem 98, 478-480]에서 본질적으로 기재된 바와 같이 MBTH(3-메틸-2-벤조티아졸리논 히드라존 히드로클로라이드)와의 반응에서 비색계로 정량화된다.

[0351] 평가 방법 B: 헤파린 활성 시험(ATIII을 사용한 정량적 헤파린 기능)

[0352] 헤파린 코팅을 포함하는 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 경우, 장치의 헤파린 활성은 문헌[Pasche, et al. "A binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions"(Artif. Organs 1991; 15:281-491, 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨) 및 Larsen M. L, et al. "Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA"(S-2238) (Thromb. Res. 1978; 13:285-288, 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)]에 의해 기재된 바의 항트롬빈III(ATIII)에 결합하는 헤파린의 능력

또는 성능을 측정함으로써 측정될 수 있고, 고체 물체의 혈전저항 성질을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 세척된 샘플은 용액 중의 과량의 항트롬빈과 함께 인큐베이션되어 헤파린 표면의 모든 이용 가능한 항트롬빈 결합 부위를 포화시킨다. 비특이적으로 흡착된 항트롬빈은 염 용액을 사용하여 헹군다. 후속하여, 표면 결합된 헤파린에 특이적으로 결합된 항트롬빈은 고농도에서 헤파린 용액과 함께 인큐베이션 하여 방출된다. 마지막으로, 헤파린 표면에서 방출된 항트롬빈은 발색성 트롬빈 기재를 기반으로 한 트롬빈 억제 어세이에서 측정된다. 결과는 장치의 겉보기 평방 센티미터당 결합된 피코몰 항트롬빈 III(ATIII)(pmol ATIII/cm^2 고체 물체 표면)으로 표시된다. 겉보기 고체 물체 표면적은 다공질 물질로 구성된 고체 물체의 다중 피복 표면이나 다공성 고려 사항을 고려하지 않는다. 고체 물체의 표면이 다공질인 경우, 표면적에 대한 다공성의 효과는 이러한 계산에서 고려하지 않는다. 예를 들어, 튜브형 이식편의 내부 표면을 포함하는 기재 물질에 고정된 헤파린이 있는 원통형의 튜브형 ePTFE 혈관 이식편(다공질 물질로 만들어짐)의 겉보기 표면적은 모든 원통형 기하학적구조에 대해 $2\pi rL$로 계산된다; 여기서 r은 이식편 내부 반경이고; L은 축 길이이며; π는 숫자 파이이다. 이 방법은 ATIII 결합 활성을 갖는 모든 항응고제 실체의 활성을 측정하는 데 사용할 수 있다.

[0353] 평가 방법 C: 톨루이딘 블루 염색 시험(헤파린 분포)

[0354] 헤파린 분포는 톨루이딘 블루 염색 용액을 사용하여 평가된다. 용액은 200mg의 톨루이딘 블루를 1L의 물에 용해시켜 제조된다. 샘플은 충분한 물로 헹구기 전에 2분 동안 염색 용액에 적용된다. 블루/바이올렛 염색은 음으로 하전된 헤파린 분자가 외부 코팅층에 균일하게 분포되어 있음을 나타낸다.

[0355] 평가 방법 D: 제타 전위 측정(표면 전하의 인디케이터)

[0356] 표면 전하의 인디케이터로서 코팅의 제타 전위를 SurPASS 기기에서 결정한다. 측정은 표준으로 KCl 또는 NaCl과 같은 단순 전해질의 1mM 용액인 전해질을 표면 상에 순환시켜 수행된다. 결과의 스트리밍 전위를 측정하고 제타 전위를 결정하는데 사용한다. 코팅의 제타 전위는 용액에 각기 산 또는 염기를 첨가하여 pH 범위 3 내지 9에서 결정한다. 제타 전위는 문헌 [T. Luxbacher, The ZETA guide, Principles of the streaming potential technique, first edition, published by Anton Paar GMBH, ISBN 978-3-200-03553-9(이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)]에 기재된 바와 같이 하기 식 1을 사용하여 계산한다.

[0357] $$\zeta = \frac{dU}{dp} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times K_B \quad \text{(식 1)}$$

[0358] dU/dP = 스트리밍 전위의 기울기 vs 차압,

[0359] K_B = 전해질 전도도

[0360] η = 전해질 점도

[0361] ε = 전해질의 유전 계수

[0362] ε_0 = 진공 유전율.

[0363] 평가 방법 E: 혈액 루프 평가 시험(혈소판 손실 측정)

[0364] 혈액 접촉 평가는 혈전저항 성질을 평가하기 위해 코팅된 물체 상에서 수행할 수 있다. 고체 물체가 PVC 튜빙 조각과 같은 튜브형 장치일 때 사용할 수 있는 절차는 하기와 같다. 첫째로, 코팅된 튜빙의 내강 측을 0.15M 염수로 15시간 동안 1mL/min의 유속으로 세척하여 임의의 느슨하게 결합된 항응고제 실체의 완전한 습윤 및 제거를 보장하여, 안정한 표면을 유지하도록 한다. 세척된 튜빙은 그 후 본질적으로 문헌[Andersson *et al.* (Andersson, J.; Sanchez, J.; Ekdahl, K. N.; Elgue, G.; Nilsson, B.; Larsson, R. J Biomed Mater Res A 2003, 67(2), 458-466, 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)]에 따라 20 rpm에서 수행된 챈들러(Chandler) 루프 모델에서 인큐베이션한다. 신선한 혈액과 루프에서 수집된 혈액의 혈소판을 세포 계수기에서 계수하여 혈소판의 손실을 측정한다. 혈소판의 큰 손실은 표면의 혈전저항 성능이 불량함을 나타낸다. 반대로 혈소판의 최소 손실은 혈전저항성 표면을 나타낸다.

[0365] 평가 방법 F: 혈액 루프 평가 시험(F1 + 2 측정 용)

[0366] F1 + 2(프로트롬빈 단편)의 결정은 응고에 대한 활성화 마커로(즉, 트롬빈의 간접 측정으로서) 사용한다. F1 + 2는 트롬빈 형성에 정비례하며 트롬빈 생성의 간접 측정으로 해석되고, 고체 물체의 혈전저항 성질을 평가하는 데 사용할 수 있다. 혈장에서 F1 + 2의 정량적 결정은 표준 ELISA 키트(Enzyme-Linked Immuno Sorbent

Assay)(Enzygnost F1 + 2 ELISA, OPBDG03, Siemens)를 사용하여 효소 면역분석으로 수행된다. 샘플의 F1 + 2 항원은 96 웰 마이크로타이터 플레이트의 코팅된 표면상에서 포획된 항체에 커플링되고 후속하여 퍼옥시다아제 컨쥬케이트된 항 F1 + 2 항체에 의해 검출된다. 커플링된 퍼옥시다아제의 양은 특정 기재인 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)을 첨가하여 측정한다. 기재의 발색소로의 효소적 전환은 희석된 황산의 첨가에 의해 정지한다. 웰의 450 nn에서의 흡광도는 샘플내의 F1 + 2 농도에 비례한다. 샘플의 농도는 기지 농도의 F1 + 2를 사용하는 표준 곡선과 비교하여 결정한다.

[0367] 평가 방법 G: 용액 내의 덱스트란 설페이트와 같은 음이온성 중합체의 분자량

[0368] 덱스트란 설페이트 샘플의 분자량 결정은 겔 투과 크로마토 그래피(GPC) 기기에서 수행한다. 덱스트란 설페이트 샘플을 수계 용출 배지에 용해시키고 분자량 범위 1,000 Da-100,000 Da(수퍼로스 컬럼) 또는 100,000 Da-2,000,000 Da(세파크릴 컬럼)에 적절한 GPC 기기에서 분석한다. 적절한 분자량의 덱스트란 설페이트 표준을 사용하여 보정 곡선의 정확성을 검증한다. 덱스트란 설페이트와 같은 중합체는 분산된 분자이다. 즉, 상이한 분자량 평균으로 기술할 수 있는 분자량 분포를 갖는다. 일반적으로 보고되는 값은 중량 평균 분자량(Mw)이다. GPC 기술을 사용하여 중합체의 분자량을 결정하는 이론을 설명하는 문헌[Odian G., Principles of Polymerization, Third edition, Section 1.4 Molecular weight, p. 24(이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)]을 참조한다. 덱스트란 설페이트 이외의 음이온성 중합체의 분자량도 이 방법을 사용하여 또한 결정할 수 있다.

[0369] 평가 방법 H: 용액 내의 덱스트란 설페이트와 같은 음이온성 중합체의 용액 전하 밀도

[0370] 전하 밀도의 정량적 결정은 고분자전해질 용액(0.001 M)(폴리디알릴디메틸 암모늄 클로라이드(Poly-Dadmac) 및 나트륨 폴리에틸렌 설페이트(PES-Na))의 적정을 통해 MÜtek 입자 전하 검출기에서 수행된다. 샘플은 0.06 g/L의 농도로 물(허용 최대 점도 6000mPas)에 용해시킨다. pH는 모든 샘플 용액에 대해 3으로 조정한다. 샘플 용액 당 10 mL가 각각의 측정에 첨가되고 이어서 적절한 고분자전해질 용액이 3초당 1단위 간격으로 적정한다. 문헌[S. Farris et al., Charge Density Quantification of Polyelectrolyte Polysaccharides by Conductometric Titration: An Analytical Chemistry Experiment, J. Chem. Educ., 2012, 89 (1), pp 121-124(이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)] 참조. 덱스트란 설페이트 이외의 음이온성 중합체의 용액 전하 밀도도 또한 이 방법을 사용하여 결정 할 수 있다.

[0371] 평가 방법 I: 에너지 분산형 X 선 분광법을 사용한 주사 전자 현미경 검사(코팅 커버리지 및 균일성)

[0372] TM3000은 히타치(Hitachi)에서 제조한 테이블 주사 전자 현미경(SEM)으로, 예컨대 샘플 두께, 토포그래피(표면 구조) 및 표면 커버리지에 대한 정보를 얻기위해 사용된다. 전자가 이미지를 생성하는데 사용되므로 기존의 광학 현미경에 비해 테이블 SEM으로 더 높은 배율을 달성할 수 있다. TM3000에는 또한 Quantax70이 장착되어 있다. 이것은 샘플의 화학 조성을 결정하기 위해 사용되는 에너지 분산형 X 선 분광기(EDS)이다. 또한, 샘플의 상이한 부분을 용이하게 분석하는 부속품으로서 회전/틸트 테이블이 있다. 샘플을 탄소 테이프(접지 역할도 함)로 홀더에 장착한 다음 시험 챔버에 배치한다. 챔버를 샘플 평가가 시작되기 전에 더 낮은 압력으로 배기한다. SEM 기술은 샘플을 가로지르는 전자빔의 주사를 기반으로 하며, 일부 전자는 반사된 후방 산란 전자이고, 한편 다른 전자는 2차 전자를 실행한다. 검출기는 반사된 후방 산란 전자에 의해 생성된 전류를 측정하는 데 사용한다. 전류는 각각의 픽셀이 샘플의 위치에 해당하는 디스플레이에서 이미지화된다. 많은 전자가 반사되면(높은 전자 밀도) 밝은 픽셀이 얻어지고, 적은 전자(낮은 전자 밀도)가 반사되면 더 어두운 픽셀이 얻어진다.

[0373] 평가 방법 J: 깊이 프로파일링을 사용한 X 선 광전자 분광법(XPS)(코팅 두께)

[0374] X 선 광전자 분광법(XPS 또는 ESCA)은 고체 물체의 비파괴 화학 분석을 제공하는 가장 널리 사용되는 표면 특성 결정 기술이다. 샘플은 단일 에너지 X 선으로 조사되어 샘플 표면의 상부 1 nm-10 nm 에서 광전자방출이 야기된다. 전자 에너지 분석기는 광전자의 결합 에너지를 결정한다. 수소와 헬륨을 제외한 모든 원소의 정성 및 정량 분석은 ~ 0.1 - 0.2 원자%의 검출 한계로 가능하다. 분석 스폿 크기는 10㎛ 내지 1.4mm 범위이다. 또한 원소 및 화학적 상태 맵핑을 사용하여 외관의 표면 이미지를 생성하는 것도 가능하다. 깊이 프로파일링은 각도 의존 측정을 사용하여 표면의 상부 10nm 내에서 또는 이온 에칭과 같은 파괴 분석을 사용하여 코팅 깊이 전체에서 비파괴 분석을 얻는 것이 가능하다.

[0375] 평가 방법 K: 상승된 온도 및 습도 시험(살균 안정성에 대한 일반 모델)

[0376] 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체는 통기성 폴리에틸렌 파우치(예컨대 타이벡(Tyvek) 파우치)에 배치된다. 파우치는 1주일 동안 40℃ 및 50 % 상대 습도에서 기후 챔버(예컨대 Climacell)에 배치한 다음 진공 챔버에

서 2시간 건조시킨다. 살균 안정성에 대해 이러한 일반 모델을 수행한 후, 코팅된 물체의 혈전저항 성질/활성화를 예컨대 평가 방법 E 또는 F를 사용하여 평가한다.

[0377] 평가 방법 L: 에틸렌 옥시드에 대한 안정성

[0378] 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체를 통기성 폴리에틸렌 파우치(예컨대 타이벡 파우치)에 넣고 50℃ 및 60 % 상대 습도에서 적어도 12시간 프리컨디셔닝하고 이어서 366 mBar의 압력 및 50℃에서 2시간 에틸렌 옥시드에 노출시킨다. 그 후 챔버를 적어도 10시간 동안 50℃에서 탈기한다. 에틸렌 옥시드에 의한 살균은 시너지 헬스 아일랜드 엘티디(Synergy Health Ireland Ltd)에서 수행할 수 있다. 살균 후, 코팅된 물체의 혈전저항 성질/활성화를 예컨대 평가 방법 E 또는 F를 사용하여 평가한다.

[0379] 평가 방법 M: 헤파린 활성도 시험(HCII를 사용한 정량적 헤파린 기능)

[0380] 헤파린 코팅을 포함하는 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 경우, 장치의 헤파린 활성은 WO2009/064372A2(Gore Enterprise Holdings, Inc .; 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 헤파린 보조 인자 II(HCII)에 결합하는 헤파린의 능력 또는 성능을 측정함에 의해, 문헌[Larsen M.L., et al., "Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA(S- 2238)." Thromb Res 13:285-288 (1978) 및 Pasche B., et al., "A binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions." Artif. Organs 1991; 15:281-491]에 기재된 바와 같은 어세이를 사용하여 기지 양의 헤파린 보조 인자 II(HCII)에 결합하는 헤파린의 능력 또는 성능을 측정함에 의해 측정할 수 있고, 고체 물체의 혈전저항 성질을 평가하는 데 사용할 수 있다. 결과는 고체 물체 표면의 겉보기 평방 센티미터당 결합된 피코몰 헤파린 보조인자 II(HCII)(pmol HCII/cm^2 고체 물체 표면)로 표시된다. 겉보기 고체 물체 표면적은 다공질 물질로 구성된 장치의 다중 피복 표면이나 다공성 고려 사항을 고려하지 않는다. 장치의 표면이 다공질인 경우, 표면적에 대한 다공성의 효과는 이러한 계산에서 고려하지 않는다. 예를 들어, 튜브형 이식편의 내부 표면을 포함하는 기재 물질에 고정된 헤파린이 있는 원통형의 튜브형 ePTFE 혈관 이식편(다공질 물질로 만들어짐)의 겉보기 표면적은 모든 원통형 기하학적구조에 대해 2πrL로 계산된다; 여기서 r은 이식편 내부 반경이고; L은 축 길이이며; π는 숫자 파이이다. 이 방법은 HCII 결합 활성을 갖는 모든 항응고제 실체의 활성을 측정하는 데 사용할 수 있다.

[0381] 평가 방법 N - 표면 생체적합성

[0382] 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체 표면의 생체적합성은 문헌[Lappegard, K. T 2008, J. Biomed. Mater. Res. Vol 87, 129-135(이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)]에 기재된 바와 같이 평가할 수 있다. 염증 반응을 평가기 위해 사용할 수 있는 절차는 하기와 같다. 먼저 코팅된 고체 물체를 0.15 M 염수 용액으로 15분 동안 세척한다. 습윤된 코팅된 고체 물체를 전혈을 함유하는 헤파린화된 PVC 튜빙에 놓고 20rpm의 순환 루프에서 회전하도록 방치한다(대표적인 절차에 대하여 문헌 [Ekdahl K. N., Advances in Experimental Medicine and Biology, 2013, 735, 257-270 (이의 전체가 본원에 참조로 포함됨))] 참조). 인큐베이션 후, 혈액은 4℃에서 3220 g을 15분 동안 원심 분리한다. 혈장은 나중에 사이토카인 분석을 위해 -70℃에서 분취량으로 동결시킨다. 혈장 샘플은 Lappegard 등에 의해 기술된 방법에 따라 다중 사이토카인 어세이(Bio-Plex Human Cytokin 27-Plex Panel, Bio-Rad Laboratories, 캘리포니아주 에르쿨레스(Hercules) 소재)를 사용하여 분석한다.(위).

[0383] 음성 대조는 임의의 장치 없이 헤파린화된 PVC의 빈 루프이다. 이것은 인큐베이션된 혈액이 염증 마커의 양이 없거나 최소한 임을 나타내어야 하는 비염증 대조를 나타낸다. 양성 대조는 임의의 장치 없이 비헤파린화된 PVC의 빈 루프이다. 이것은 더 많은 양의 염증 마커가 관찰되어야 하는 염증 대조를 나타낸다. 대조는 실험 및 혈액의 품질을 보장하기 위해 포함되어 있다.

[0384] 평가 방법 O - 소산이 있는 수정 결정 미량저울(코팅 두께)

[0385] Q-센스 E4는 소산이 있는 결정 미량저울(QCM-D) 모니터링 기기이다. QCM-D는 분자 층의 질량 및 구조적 성질 모두를 측정하는 기술이며 초고감도 중량측정 디시브로 간주될 수 있다.

[0386] QCM 센서는 AT 컷 결정이 가장 일반적으로 사용되는 얇은 수정 디스크로 구성된다. 수정 디스크는 두 전극 사이에 위치하며 수정 결정에 전압을 인가하여 이의 공진 주파수에서 진동하도록 만들 수 있다. 수정 표면의 질량 변화는 사우어브레이(Sauerbrey) 관계를 통해 관련된 진동 결정의 주파수 변화를 유도한다(문헌[Rodahl, M., et al., Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q factor measurement in gaseous and liquid environment. Review of scientific environments, 1995. 66(7): p.3924-3930.(이의 전체가 본원에 참조로 포

함됨)] 참조). 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 코팅 두께는 건조 코팅 두께로 보고된다.

[0387] 평가 방법 P - 헤파린 단편 분획의 분자량 결정

[0388] 헤파린 단편 분획의 분자량은 본질적으로 USP <209> 저분자량 헤파린 분자량 결정(Low Molecular Weight Heparin Molecular Weight Determinations)에 따라 연속하여 2개의 Superdex 컬럼(S-75 및 S-200)으로 구성된 시스템에서 분석 겔 투과 크로마토그래피(GPC)로 결정된다. 피크 위치는 분자량 보정을 위한 저분자량 헤파린에 대한 제2차 국제 표준(2nd International Standard for Low Molecular Weight Heparin for Molecular Weight Calibration)(NIBSC, 영국)의 용출 프로파일을 기반으로 식별되며, 표준의 최소 지연 피크는 디사카라이드이다.

[0389] 평가 방법 Q - 헤파린 단편 농도 결정

[0390] 용액 중의 단리된 헤파린 단편의 양은 헤파린 표준 곡선과 관련된 카르바졸 어세이 (Bitter, T .; Muir, HM, Anal. Biochem., 1962, (4), 330-334)에 의해 우론산 함량을 분석하여 추정한다.

[0391] **실시예 1: 고체 물체의 코팅 방법(항응고제 실체의 외부 코팅층이 있는 양이온성 및 음이온성 중합체의 층상 코팅)**

[0392] 일반 코팅 방법 - 튜빙

[0393] 튜빙 섹션(예컨대 PVC 또는 PUR 튜빙)의 내강 표면은 본질적으로 EP0086186A1, EP0495820B1 및 EP0086187A1(이들 모두는 참조로 이의 전체가 본원에 포함됨)에서 Larm 등이 기재한 방법을 사용하여 양이온성 중합체와 음이온성 중합체의 층-층 코팅으로 코팅된다.

[0394] 구체적으로, 튜빙의 내강 표면은 먼저 이소프로판올과 산화제로 세정된다. 코팅 이중 층은 양이온성 중합체(폴리아민 0.05g/L 물)와 음이온성 중합체(덱스트란 설페이트, 0.1g/L 물)의 흡착을 번갈아 가며 구축된다. 폴리아민은 이작용성 알데히드(크로톤알데히드)로 가교된다. 덱스트란 설페이트 원료는 하기 각각의 실시예에 명시된 바와 같이 다양하고, 다양한 농도에서 다양한 나트륨염의 존재하에 적용되며, 이는 다시 하기의 각각의 실시예에서 명시된 바와 같다. 폴리아민과 술페이트화된 폴리사카라이드의 모든 쌍을 하나의 이중 층으로 지칭한다. 즉 이중 층은 양이온성 및 음이온성 중합체의 한 층으로 정의되며 동일한 조건이 각각의 이중 층을 구축하는 데 사용된다. 튜빙의 내강 표면은 3개의 이중 층으로 코팅된다(단일 이중 층으로 코팅된 고체 물체에 대하여는 도 1 참조). 마지막으로 폴리아민의 최외층이 그 후 흡착된다.

[0395] 그 후 헤파린은 본질적으로 EP0086186A1 및 EP0495820B1 (둘 모두는 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)에서 Larm 등에 의해 기술된 바와 같이 환원적 아민화를 통해 폴리아민의 최외층에 고정된다.

[0396] 일반 코팅 방법 - 강철 쿠폰

[0397] 임의의 고체 물체는 튜빙에 대하여 상술한 일반적인 코팅 방법을 사용하여 코팅할 수 있다. 강철 쿠폰을 이용한 하기의 실시예에서, 쿠폰의 전체 표면을 코팅하였다.

[0398] 실시예 1.1-1.56에서 사용된 덱스트란 설페이트

[0399] 평가된 덱스트란 설페이트는 하기 표 1에서 제시된 바와 같이 상이한 판매회사에서 구입하였다.

표 1

실시예에서 평가된 덱스트란 설페이트

덱스트란 설페이트 번호	판매회사	Mw* [kDa]	용액 전하 밀도** [μeq/g](pH 3)
1 (참고예 덱스트란 설페이트)	시그마 알드리치	50	6.1
2 (참고예 덱스트란 설페이트)	티디비 컨설턴시	100	5.4
3 (참고예 덱스트란 설페이트)	티디비 컨설턴시	600	3.0
4	티디비 컨설턴시	800	6.3
5	피케이 케미칼즈 에이/에스	4000	6.2
6	알파 에이사	5000	5.3
7	시그마 알드리치	8000	6.4

* 평가 방법 G에 따라 결정된 중량 평균 분자량 (Mw)
** 평가 방법 H에 따라 결정된 용액 전하 밀도

[0400]

[0401] 실시예 1.1: 덱스트란 설페이트 1 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0402] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 1(표 1 참조)을 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0403] 실시예 1.2: 덱스트란 설페이트 1 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙상의 코팅 제조

[0404] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 1(표 1 참조)을 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0405] 실시예 1.3: 덱스트란 설페이트 2 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙상의 코팅 제조

[0406] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 2(표 1 참조)를 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0407] 실시예 1.4: 덱스트란 설페이트 3 및 0.05 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0408] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 3(표 1 참조)을 0.05 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0409] 실시예 1.5: 덱스트란 설페이트 3 및 0.1 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0410] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 3(표 1 참조)을 0.1 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0411] 실시예 1.6: 덱스트란 설페이트 3 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙상의 코팅 제조

[0412] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 3(표 1 참조)을 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0413] 실시예 1.7: 덱스트란 설페이트 3 및 1.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0414] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 3(표 1 참조)을 1.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0415] 실시예 1.8: 덱스트란 설페이트 3 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0416] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 3(표 1 참조)을 1.7 M의

NaCl 농도에서 적용하였다.

[0417] 실시예 1.9: 덱스트란 설페이트 3 및 2.6 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0418] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 3(표 1 참조)을 2.6 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0419] 실시예 1.10: 덱스트란 설페이트 3 및 3.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0420] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 3(표 1 참조)을 3.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0421] 실시예 1.11: 덱스트란 설페이트 4 및 0.05 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0422] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 4(표 1 참조)를 0.05 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0423] 실시예 1.12: 덱스트란 설페이트 4 및 0.1 M의 NaCl 농도를 사용항 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0424] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 4(표 1 참조)를 0.1 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0425] 실시예 1.13: 덱스트란 설페이트 4 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0426] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 4(표 1 참조)를 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0427] 실시예 1.14: 덱스트란 설페이트 4 및 1.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0428] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 4(표 1 참조)를 1.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0429] 실시예 1.15: 덱스트란 설페이트 4 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0430] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 4(표 1 참조)를 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0431] 실시예 1.16: 덱스트란 설페이트 4 및 3.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0432] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 4(표 1 참조)를 3.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0433] 실시예 1.17: 덱스트란 설페이트 5 및 0.05 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0434] PVC 튜빙을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.05 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0435] 실시예 1.18: 덱스트란 설페이트 5 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0436] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0437] 실시예 1.19: 덱스트란 설페이트 5 및 0.5 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0438] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.5 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0439] 실시예 1.20: 덱스트란 설페이트 5 및 0.85 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0440] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.85 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0441] 실시예 1.21: 덱스트란 설페이트 5 및 1.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0442] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 1.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0443] 실시예 1.22: 덱스트란 설페이트 5 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0444] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0445] 실시예 1.23: 덱스트란 설페이트 5 및 3.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0446] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 3.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0447] 실시예 1.24: 덱스트란 설페이트 6 및 0.05 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조.

[0448] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 6(표 1 참조)을 0.05 M의 NaCl 농도에서 적용하였다

[0449] 실시예 1.25: 덱스트란 설페이트 6 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0450] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 6(표 1 참조)을 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0451] 실시예 1.26: 덱스트란 설페이트 6 및 0.5 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0452] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 6(표 1 참조)을 0.5 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0453] 실시예 1.27: 덱스트란 설페이트 6 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0454] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 6(표 1 참조)을 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0455] 실시예 1.28: 덱스트란 설페이트 6 및 3.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0456] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 6(표 1 참조)을 3.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0457] 실시예 1.29: 덱스트란 설페이트 7 및 0.05 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0458] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.05 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0459] 실시예 1.30: 덱스트란 설페이트 7 및 0.1 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0460] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.1 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0461] 실시예 1.31: 덱스트란 설페이트 7 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0462] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0463] 실시예 1.32: 덱스트란 설페이트 7 및 0.5 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0464] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.5 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0465] 실시예 1.33: 덱스트란 설페이트 7 및 0.85 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0466] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.85 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0467] 실시예 1.34: 덱스트란 설페이트 7 및 1.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0468] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 1.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0469] 실시예 1.35: 덱스트란 설페이트 7 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0470] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0471] 실시예 1.36: 덱스트란 설페이트 7 및 2.6 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0472] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 2.6 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0473] 실시예 1.37: 덱스트란 설페이트 7 및 3.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0474] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 3.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0475] 실시예 1.38: 덱스트란 설페이트 7 및 3.4 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0476] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 3.4 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0477] 실시예 1.39: 덱스트란 설페이트 5 및 0.05 M의 Na_2HPO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0478] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.05 M의 Na_2HPO_4 농도에서 적용하였다.

[0479] 실시예 1.40: 덱스트란 설페이트 5 및 0.25 M의 Na_2HPO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0480] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.25 M의 Na_2HPO_4 농도에서 적용하였다.

[0481] 실시예1.41: 덱스트란 설페이트 5 및 0.85 M의 Na_2HPO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0482] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.85 M의 Na_2HPO_4 농도에서 적용하였다.

[0483] 실시예 1.42: 덱스트란 설페이트 5 및 1.7 M의 Na_2HPO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0484] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 1.7 M의 Na_2HPO_4 농도에서 적용하였다.

[0485] 실시예 1.43: 덱스트란 설페이트 5 및 0.05 M의 Na_2SO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0486] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.05 M의 Na_2SO_4 농도에서 적용하였다.

[0487] 실시예 1.44: 덱스트란 설페이트 5 및 0.25 M의 Na_2SO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0488] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.25 M의 Na_2SO_4 농도에서 적용하였다.

[0489] 실시예 1.45: 덱스트란 설페이트 5 및 0.85 M의 Na_2SO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조.

[0490] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 0.85 M의 Na_2SO_4 농도에서 적용하였다.

[0491] 실시예 1.46: 덱스트란 설페이트 7 및 0.85 M의 Na_2HPO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0492] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.85 M의 Na_2HPO_4 농도에서 적용하였다.

[0493] 실시예 1.47: 덱스트란 설페이트 7 및 0.85 M의 Na_2SO_4 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0494] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.85 M의 Na_2SO_4 농도에서 적용하였다.

[0495] 실시예 1.48: 덱스트란 설페이트 7 및 0.05 M의 NaCl 농도를 사용한 PUR 튜빙 상의 코팅 제조

[0496] PUR 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.05 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0497] 실시예 1.49: 덱스트란 설페이트 7 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 PUR 튜빙 상의 코팅 제조

[0498] PUR 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0499] 실시예 1.50: 덱스트란 설페이트 7 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 PUR 튜빙 상의 코팅 제조

[0500] PUR 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0501] 실시예 1.51: 덱스트란 설페이트 7 및 3.0 M의 NaCl 농도를 사용한 PUR 튜빙 상의 코팅 제조

[0502] PUR 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 3.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0503] 실시예 1.52: 덱스트란 설페이트 7 및 0.05 M의 NaCl 농도를 사용한 강철 쿠폰 상의 코팅 제조

[0504] 강철 쿠폰(15.0 mm x 3.35 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.05 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0505] 실시예 1.53: 덱스트란 설페이트 7 및 0.25 M의 NaCl 농도를 사용한 강철 쿠폰 상의 코팅 제조

[0506] 강철 쿠폰(15.0 mm x 3.35 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 0.25 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0507] 실시예 1.54: 덱스트란 설페이트 7 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 강철 쿠폰 상의 코팅 제조

[0508] 강철 쿠폰(15.0 mm x 3.35 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0509] 실시예 1.55: 덱스트란 설페이트 7 및 3.0 M의 NaCl 농도를 사용한 강철 쿠폰상의 코팅 제조

[0510] 강철 쿠폰(15.0 mm x 3.35 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 7(표 1 참조)을 3.0 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0511] 실시예 1.56: 덱스트란 설페이트 2 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 PVC 튜빙 상의 코팅 제조

[0512] PVC 튜빙(I.D. 3 mm)을 상술한 일반적인 절차에 따라 코팅하였다. 덱스트란 설페이트 2(표 1 참조)를 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용하였다.

[0513] **실시예 2a: 다양한 NaCl 농도에서 상이한 덱스트란 설페이트를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 정규화된 헤파린 활성**

[0514] 다양한 NaCl 농도에서 실시예 1.11-1.19, 1.21-1.32, 1.34-1.38(덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7에 해당함)에 따라 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 활성을 평가 방법 B(헤파린 활성 시험)에서 명시된바와 같이 측정하였다.

[0515] 시험된 모든 코팅된 고체 물체는 평가 방법 B로 결정된 경우 적어도 1 pmol/cm^2의 헤파린 활성을 나타내었다. 하기 표 2에 나타낸 헤파린 활성 값은 1.7 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 5를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙에 대해 관찰된 가장 높은 헤파린 활성 값으로 정규화된다(실시예 1.22).

표 2

다양한 NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7을 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 정규화된 헤파린 활성(%)

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	4	5	6	7
	NaCl 농도 [M]	정규화된 헤파린 활성 [%]			
1.11 / 1.17 / 1.24 / 1.29	0.05	28	46	27	42
1.12 / - / - / 1.30	0.10	33	-	-	62
1.13 / 1.18 / 1.25 / 1.31	0.25	46	62	48	60
- / 1.19 / 1.26 / 1.32	0.50		59	38	78
1.14 / 1.21 / - / 1.34	1.00	93	95	-	82
1.15 / 1.22 / 1.27 / 1.35	1.70	92	100	62	98
- / - / - / 1.36	2.60	-	-	-	86
1.16 / 1.23 / 1.28 / 1.37	3.00	71	99	50	64
- / - / - / 1.38	3.40	-	-	-	38

[0516]

[0517] 0.25 M 및 1.7 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 정규화된 헤파린 활성 값을 도 2에 나타낸다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이 두 가지 염 농도 모두 허용 가능한 혈전저항 성질을 가진 코팅을 야기하였지만, 덱스트란 설페이트 층을 추가하는 단계에서 더 높은 염 농도(1.7 M)의 사용은 더 낮은 염 농도(0.25 M)의 사용보다 더 높은 헤파린 활성을 야기한다. 0.25 M 미만의 염 농도의 사용은 더 낮은 헤파린 활성이 초래됨을 표 2로부터 알 수 있다. 가장 높은 헤파린 활성은 전하 밀도가 6 μeq/g 초과인 덱스트란 설페이트(덱스트란 설페이트 4, 5, 7)을 사용하여 얻어졌다.

[0518] **실시예 2b: 다양한 농도의 상이한한 염과 함께 덱스트란 설페이트 5를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 정규화된 헤파린 활성**

[0519] 다양한 농도의 NaCl, Na_2HPO_4 또는 Na_2SO_4를 사용한 실시예 1.17, 1.18, 1.20, 1.22, 및 1.39-1.45(덱스트란 설페이트 5에 해당함)에 따른 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 활성을 평가 방법 B(헤파린 활성 시험)에 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0520] 시험된 모든 코팅된 고체 물체는 적어도 1 pmol/cm^2의 헤파린 활성을 나타내었다. 하기 표 3에 나타낸 헤파린 활성 값은 1.70 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 5를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙(실시예 1.22)에 대해 관찰된 가장 높은 헤파린 활성으로 정규화된다.

표 3

다양한 농도에서 상이한 염을 사용하여 코팅된 PVC 튜빙(덱스트란 설페이트 5)의 정규화된 헤파린 활성(%)

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	5		
	염	Na_2HPO_4	Na_2SO_4	NaCl
	염 농도 [M]	정규화된 헤파린 활성[%]		
1.39 / 1.43 / 1.17	0.05	7	34	46
1.40 / 1.44 / 1.18	0.25	11	18	62
1.41 / 1.45 / 1.20	0.85	25	30	32
1.42 / - / 1.22	1.70	36	*	100

*1.7 M에서 물에 용해되지 않음

[0521]

[0522] 표 3의 정규화된 헤파린 활성 값을 도 3에 나타낸다. 도 3에서 알 수 있는 바와 같이 덱스트란 설페이트 층을 추가하는 단계에서 더 높은 염 농도를 사용한 헤파린 활성에 대한 유익한 효과가 다양한 염에 의해 나타난다. 가장 높은 헤파린 활성 값은 염화나트륨을 사용하여 얻어졌다.

[0523] **실시예 2c: 0.85 M 농도에서의 상이한 염과 함께 덱스트란 설페이트 5 및 7을 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 정규화된 헤파린 활성**

[0524] 0.85 M의 NaCl, Na_2HPO_4 또는 Na_2SO_4를 사용한 실시예 1.20, 1.33, 1.41 및 1.45-1.47(덱스트란 설페이트 5 및 7에 해당함)에 따른 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 활성을 평가 방법 B(헤파린 활성 시험)에 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0525] 시험된 모든 코팅된 고체 물체는 적어도 1 pmol/cm^2의 헤파린 활성을 나타내었다. 하기 표 4에 나타낸 헤파린 활성 값은 실시예 1.22에서 관찰된 가장 높은 헤파린 활성 값으로 정규화된다.

표 4

0.85 M 농도의 상이한 염을 사용하여 코팅된 PVC 튜빙(덱스트란 설페이트 5 및 7)의 정규화된 헤파린 활성(%)

[0526]

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	염 농도 [M]	Na_2HPO_4	Na_2SO_4	NaCl
1.41 / 1.45 / 1.20	5	0.85	25	30	32
1.46 / 1.47 / 1.33	7	0.85	43	38	45

[0527] 다양한 염, 예컨대 NaCl, Na_2HPO_4 및 Na_2SO_4의 사용은 헤파린 활성 값에 유의한 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다. 염 농도는 사용되는 염에 관계없이 헤파린 활성에 영향을 줄 것이다.

[0528] **실시예 2d: 다양한 농도의 NaCl과 함께 덱스트란 설페이트 7을 사용한 다양한 코팅된 고체 물체의 정규화된 헤파린 활성**

[0529] 다양한 농도의 NaCl을 사용한 실시예 1.29, 1.31, 1.35, 1.37 및 1.48-1.55(덱스트란 설페이트 7에 해당함)에 따라 다양한 코팅된 고체 물체의 헤파린 활성을 평가 방법 B(헤파린 활성 시험)에 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0530] 시험된 모든 코팅된 고체 물체는 적어도 1 pmol/cm^2의 헤파린 활성을 나타내었다. 하기 표 5에 나타낸 헤파린 활성 값은 실시예 1.22에서 관찰된 가장 높은 헤파린 활성 값으로 정규화된다.

표 5

다양한 농도의 NaCl을 사용한 다양한 코팅된 고체 물체(덱스트란 설페이트 7)의 정규화된 헤파린 활성(%)

[0531]

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	염 농도 [M]	PVC	PUR	강철
1.29 / 1.48 / 1.52	7	0.05	46	40	65
1.31 / 1.49 / 1.53	7	0.25	60	62	81
1.35 / 1.50 / 1.54	7	1.70	98	110	135
1.37 / 1.51 / 1.55	7	3.00	64	72	88

[0532] 코팅된 고체 물체의 물질에 관계없이 염 농도가 헤파린 활성에 영향을 줄 것임은 표 5로부터 명백하다. 폴리 우레탄(PUR) 및 강철 쿠폰으로 만들어진 튜빙을 다양한 염 농도에서 덱스트란 설페이트 7로 코팅하였으며 결과의 정규화된 헤파린 활성 값은 명확한 염 의존성이 있음을 나타낸다.

[0533] **실시예 2e: 덱스트란 설페이트 5 및 1.7 M의 NaCl 농도를 사용한 헤파린 단편(옥타사카라이드)으로 코팅된 PVC 튜빙의 정규화된 헤파린 활성**

[0534] PVC 튜빙(I.D. 3mm)을 1.7 M의 NaCl 농도에서 적용된 덱스트란 설페이트 5(표 1 참조)를 사용하여 상술한 일반적인 절차에 따라 헤파린의 단편(옥타사카라이드)으로 코팅하였다.

[0535] 헤파린의 해중합 후 분별에 의해 제조된 헤파린 단편 분획

[0536] 주로 8개의 당 단위(octa) 크기의 올리고사카라이드는 천연 헤파린의 부분적인 아질산 절단에 이어 겔 크로마토그래피에 의한 분별로 제조하였다. 아질산 절단에의해 생성된 옥타사카라이드는 기능적 활성 서열을 함유할 수 있는 가장 짧은 단편이다(Thunberg L. et al, FEBS Letters 117 (1980), 203-206).

[0537] 헤파린의 해중합: 10 g의 헤파린 나트륨을 물 36ml에서 밤새 교반하여 용해시켰다. 0.30 g의 $NaNO_2$를 헤파린 용액에 첨가하고 용해시켰다. 용액을 4M HCl을 첨가하여 pH 2.5로 산성화하였다. 실온에서 2시간의 총 반응 시간 후, 용액을 4M NaOH를 첨가하여 중화시켰다.

[0538] 분해 혼합물은 겔 투과 크로마토 그래피(GPC)에 의해 분자 크기를 기준으로 분리하였으며, 여기서 3ml의 부분을 2.5 ml/min의 유속으로 컬럼(HiLoad 26/600 Superdex 30pg, 이동상 0.15 M NaCl)에 적용하였다. 수집된 분획(3ml)을 본질적으로 문헌 [Smith R.L. and Gilkerson E (1979), Anal Biochem 98, 478-480]에서 기재된 바와 같이 MBTH 반응에 의해 알데히드에 대해 분석하였다. 옥타사카라이드의 용출 위치를 중심으로 한 넓은 피크가 수집되었다. 여러 분취 실행에서 얻은 조합된 올리고사카라이드 용출 분획을 증발시켜 18ml 부피로 농축하고 동일한 컬럼에서 재크로마토그래피하였다. 모든 재크로마토그래피 실행에 대해 데카-, 옥타- 및 헥사 사카라이드 단편을 나타내는 세 개의 분획을 수집하고 모았다.

[0539] 수집된 분획은 평가 방법 P에 의해 분석하였다. "헥사" 분획은 헥사사카라이드를 나타내는 주 피크와 옥타사카라이드를 나타내는 숄더로 구성된다. "옥타" 분획은 옥타사카라이드를 나타내는 주 피크와 헥사사카라이드를 나타내는 숄더 및 데카사카라이드를 나타내는 부 숄더로 구성된다. "데카" 분획은 데카사카라이드를 나타내는 주 피크와 옥타사카라이드를 나타내는 숄더 및 도데카사카라이드를 나타내는 부 숄더로 구성된다.

[0540] 헤파린 단편 분획의 농도는 평가 방법 Q(하기 표 참조)에 의해 결정하였다.

		"헥사"	"옥타"	"데카"
농도	mg/ml	4.0	6.2	3.6

[0541] 옥타사카라이드의 고정화

[0542] PVC 튜빙은 84ml의 0.05 M NaCl로 희석된 16ml의 "옥타" 분획으로 코팅하였고, 옥타 분획은 그 후 본질적으로 Larm 등의 EP0086186A1 및 EP0495820B1(둘 모두 이의 전체가 본원에 참조로 포함됨)에서 기재된 바와 같이 환원 아민화를 통해 폴리아민의 최외층에 고정시켰다.

[0543] 헤파린 단편으로 코팅된 PVC 튜빙의 톨루이딘 염색에 의한 평가

[0544] 올리고사카라이드 코팅된 표면은 평가 방법 C에서 명시된 바와 같이 톨루이딘 블루 염색 시험을 하였다. 튜빙의 내강 표면에서 헤파린 단편의 광범위한 공유 결합을 나타내는 강한 블루/바이올렛 색상이 관찰되었다. 시험된 튜빙에 대해 얻은 균일한 염색은 균일한 코팅의 형성을 나타낸다.

[0545] 헤파린 단편으로 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 밀도 평가

[0546] 표면의 헤파린 밀도는 평가 방법 A에 의해 결정하였으며 그 결과를 하기 표에 나타낸다.

[0547] 헤파린 단편으로 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 활성 평가

[0548] 옥타사카라이드 코팅된 표면(실시예 2e)의 헤파린 활성은 평가 방법 B에 의해 결정하였다. 하기 표에 나타낸 헤파린 활성 값은 1.70 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 5를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙(실시예 1.22)에 대해 관찰된 가장 높은 헤파린 활성으로 정규화된다.

실시예 번호	헤파린 밀도 (㎍/cm2)	헤파린 활성 (%)
2e	5.6	5
1.22	6.5	100

[0549]

[0550] 옥타사카라이드 코팅(실시예 2e)과 헤파린 코팅(실시예 1.22)의 헤파린 밀도 값은 유사하였지만, 옥타사카라이드 코팅의 AT 결합능(헤파린 활성; 'HA')은 헤파린 코팅에 비해 낮았다. 그러나 이는 용액 내 옥타사카라이드 분획에 의해 나타나는 상대적으로 낮은 항 FXa 활성을 고려할 때 예상되는 것이다(데이터는 나타내지 않음). 따라서, 옥타사카라이드 단편은 고정화 후 이의 AT 결합능을 실질적으로 유지하는 것으로 보인다.

[0551] **실시예 3a: 다양한 NaCl 농도에서 상이한 덱스트란 설페이트를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 농도**

[0552] 다양한 NaCl 농도에서 실시예 1.4-1.19, 1.21-1.32 및 1.34-1.38(덱스트란 설페이트 3, 4, 5, 6 및 7에 해당함)에 따라 코팅된 고체 물체(PVC 튜빙)의 헤파린 농도를 평가 방법 A에서 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0553] 시험된 모든 코팅된 고체 물체는 적어도 1 μg/cm^{2}의 헤파린 농도를 나타내었다. 헤파린 농도 값은 하기 표 6에 나타낸다.

표 6

다양한 NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 3, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 농도 (μg/cm^2)

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	3 (참고예)	4	5	6	7
	염 농도 [M]	헤파린 농도 [㎍/cm^2]				
1.4 / 1.11 / 1.17 / 1.24 / 1.29	0.05	4.8	2.9	3.4	2.9	4.0
1.5 / 1.12 / - / - / 1.30	0.10	4.8	3.2	-	-	4.7
1.6 / 1.13 / 1.18 / 1.25 / 1.31	0.25	5.1	3.0	3.7	3.9	5.7
- / - / 1.19 / 1.26 / 1.32	0.50	-	-	4.5	4.8	5.7
1.7 / 1.14 / 1.21 / - / 1.34	1.00	5.1	4.1	4.5	-	6.8
1.8 / 1.15 / 1.22 / 1.27 / 1.35	1.70	4.3	4.7	6.5	6.0	6.8
1.9 / - / - / - / 1.36	2.60	3.1	-	-	-	6.9
1.10 / 1.16 / 1.23 / 1.28 / 1.37	3.00	2.0	5.0	4.1	5.0	7.3
- / - / - / - / 1.38	3.40	-	-	-	-	6.2

[0554]

[0555] 1.7 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 3, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙에 대한 헤파린 농도를 도 4에 나타낸다. 이러한 조건하에 덱스트란 설페이트 층을 추가하는 단계에서 더 높은 분자량의 덱스트란 설페이트를 사용함으로써 헤파린 농도가 더 높아지는 경향이 있음을 도 4로부터 알 수 있다. 덱스트란 설페이트 3은 이 예에서 참조 덱스트란 설페이트이다.

[0556] 다양한 NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 3, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 농도를 도 5에 나타낸다. 덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7은 덱스트란 설페이트 층을 추가하는 단계에서 염 농도가 증가함에 따라(적어도 1.7 M까지) 헤파린 농도가 더 높아지는 경향이 나타남을 도 5로부터 알 수 있다. 0.25 M 미만의 염 농도의 사용은 일반적으로 더 낮은 헤파린 활성을 초래하는 것임을 알 수 있다. 덱스트란 설페이트 3은 이러한 경향을 따르지 않으며 사용시 이 단계에서 염 농도가 증가함에 따라 헤파린 농도는 저하된다. 덱스트란 설페이트 3은 이 예에서 참조 덱스트란 설페이트이다. 이론에 제한되지 않고, 본 발명자들은 이러한 경향의 차이를 덱

스트란 설페이트 3이 덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7보다 훨씬 낮은 전하 밀도를 갖는다는 사실에 기인한다고 생각한다.

[0557] **실시예 3b: 다양한 농도의 상이한 염과 함께 덱스트란 설페이트 5를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 농도**

[0558] 실시예 1.17, 1.18, 1.20, 1.22 및 1.39-1.45(다양한 농도에서의 NaCl, Na_2HPO_4 또는 Na_2SO_4를 사용한 덱스트란 설페이트 5에 해당함)에 따라 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 농도는 평가 방법 A에서 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0559] 시험된 모든 코팅된 고체 물체는 적어도 1 μg/cm^2의 헤파린 농도를 나타내었다. 헤파린 농도 값은 하기 표 7에 나타낸다.

표 7

다양한 농도에서 상이한 염을 사용하여 코팅된 PVC 튜빙(덱스트란 설페이트 5)의 헤파린 농도 (μg/cm^2)

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	5	5	5
	염	Na_2HPO_4	Na_2SO_4	NaCl
	염 농도 [M]	헤파린 농도 [μg/cm^2]		
1.39 / 1.43 / 1.17	0.05	2.7	3.3	3.4
1.40 / 1.44 / 1.18	0.25	3.2	3.5	3.7
1.41 / 1.45 / 1.20	0.85	5.0	4.2	3.5
1.42 / - / 1.22	1.70	5.1	*	6.5

[0560] * Na_2SO_4은 1.7 M에서 물에 용해되지 않음.

[0561] 표 7의 헤파린 농도 값을 도 6에 나타낸다. 덱스트란 설페이트 5는 상이한 염의 범위에 대해 덱스트란 설페이트 층을 추가하는 단계에서 염 농도가 증가함에 따라 헤파린 농도가 증가하는 경향을 나타내고 있음을 도 6으로부터 알 수 있다.

[0562] **실시예 3c: 0.85 M 농도의 상이한 염과 함께 덱스트란 설페이트 5 및 7을 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 농도**

[0563] 실시예 1.20, 1.33, 1.41, 1.45, 1.46 및 1.47에 따라 코팅된 PVC 튜빙의 헤파린 농도(0.85 M에서 NaCl, Na_2HPO_4 또는 Na_2SO_4를 사용한 덱스트란 설페이트 5 및 7에 해당함)를 평가 방법 A에서 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0564] 시험된 모든 코팅된 고체 물체는 적어도 1 μg/cm^2의 헤파린 농도를 나타내었다. 헤파린 농도 값은 하기 표 8에 나타낸다.

표 8

0.85 M 농도에서 상이한 염을 사용하여 코팅된 PVC 튜빙(덱스트란 설페이트 5 및 7)의 헤파린 농도 (μg/cm^2)

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	염 농도 [M]	Na_2HPO_4	Na_2SO_4	NaCl
1.41/1.45/1.20	5	0.85	5.0	4.2	3.5
1.46/1.47/1.33	7	0.85	3.3	3.6	3.7

[0565]

[0566] 다양한 염, 예컨대 NaCl, Na_2HPO_4 및 Na_2SO_4의 사용은 헤파린 농도 값에 유의하게 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다.

[0567] **실시예 3d: 다양한 농도의 NaCl과 함께 덱스트란 설페이트 7을 사용한 다양한 코팅된 고체 물체의 헤파린 농도**

[0568] 다양한 농도의 NaCl을 사용하여 코팅된 실시예 1.29, 1.31, 1.35, 1.37 및 1.48-1.55(덱스트란 설페이트 7(1

2)에 해당함)에 따른 다양한 고체 물체의 헤파린 농도를 평가 방법 A에서 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0569] 시험된 모든 코팅된 고체 물체는 적어도 1 μg /cm^2의 헤파린 농도를 나타내었다. 헤파린 농도 값을 하기 표 9에 나타낸다.

표 9

다양한 코팅된 고체 물체의 헤파린 농도(μg/cm^2)(다양한 농도에서의 NaCl과 함께 덱스트란 설페이트 7)

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	염 농도 [M]	PVC	PUR	강철
1.29 / 1.48 / 1.52	7	0.05	4.0	2.9	7.2
1.31 / 1.49 / 1.53	7	0.25	5.7	2.5	7.7
1.35 / 1.50 / 1.54	7	1.70	6.8	3.5	10.4
1.37 / 1.51 / 1.55	7	3.00	7.3	4.1	8.9

[0570]

[0571] 코팅된 고체 물체의 물질에 관계없이 염 농도가 헤파린 농도에 영향을 주는 것임은 표 9로부터 명백하다. 폴리우레탄(PUR) 및 강철 쿠폰으로 만든 튜빙을 다양한 염 농도에서 덱스트란 설페이트 7로 코팅하였으며 결과의 헤파린 농도 값은 명확한 염 의존성이 있음을 나타낸다.

[0572] **실시예 4a: 1.7 M 및 0.25 M NaCl 농도에서 상이한 덱스트란 설페이트를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 제타 전위 측정**

[0573] 실시예 1.1, 1.2, 1.3, 1.6, 1.8, 1.13, 1.15, 1.18, 1.22, 1.25, 1.27, 1.31, 1.35 및 1.56(다양한 NaCl 농도에서의 덱스트란 설페이트 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 7에 해당함)에 따라 코팅된 PVC 튜빙의 표면 전하를 평가 방법 D에서 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0574] 1.7 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 1 내지 7을 사용한 PVC 코팅된 튜빙에 대한 제타 전위 값을 표 10에 나타낸다.

표 10

1.7 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 1 내지 7을 사용한 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	델타 값 [mV]	pH (전역 최소값)	IEP
1.2	1 (참고예 덱스트란 설페이트)	20	6.1	2.6
1.56	2 (참고예 덱스트란 설페이트)	18	5.6	2.6
1.8	3 (참고예 덱스트란 설페이트)	13	4.7	2.1
1.15	4	30	4.4	2.6
1.22	5	28	4.5	2.5
1.27	6	41	3.8	2.3
1.35	7	40	4.2	2.4

[0575]

[0576] 덱스트란 설페이트 1 내지 7은 모두 pH 3 미만의 IEP를 갖는다. 그러나 저분자량 덱스트란 설페이트(참고예 덱스트란 설페이트 1-3)는 모든 바람직한 특징(즉, 상술한 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 전위 핑거

프린트)을 충족하지 않는다. 덱스트란 설페이트 1 및 2는 5 초과의 pH에서 발생하는 전역 최소값을 가지며 덱스트란 설페이트 3은 20mV 미만의 델타 값을 갖는다. 덱스트란 설페이트 4 내지 7로 코팅된 본 발명의 고체 물체는 이러한 기준을 충족한다.

[0577] 1.7 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 3, 4 및 5를 사용한 PVC 코팅된 튜빙(실시예 1.8, 1.15 및 1.22에 해당함)의 제타 전위를 도 7에 나타낸다.

[0578] 1.7 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 3, 6 및 7을 사용한 PVC 코팅된 튜빙(실시예 1.8, 1.27 및 1.35에 해당함)의 제타 전위를 도 8에 나타낸다.

[0579] 0.25 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 1 내지 7을 사용한 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위를 표 11에 나타낸다.

표 11

0.25 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 1 내지 7을 사용한 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위

[0580]

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	델타 값 [mV]	pH (전역 최소값)	IEP
1.1	1 (참고예 덱스트란 설페이트)	17	4.6	2.6
1.3	2 (참고예 덱스트란 설페이트)	23	6.1	2.7
1.6	3 (참고예 덱스트란 설페이트)	15	4.2	1.5
1.13	4	37	4.5	2.7
1.18	5	38	4.5	2.6
1.25	6	35	4.1	2.5
1.31	7	36	4.5	2.5

[0581] 덱스트란 설페이트 1 내지 7은 모두 pH 3 미만의 IEP를 갖는다. 그러나 저분자량 덱스트란 설페이트(참고예 덱스트란 설페이트 1-3)는 모든 바람직한 특징(즉, 상술한 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 전위 핑거프린트)을 충족하지 않는다. 덱스트란 설페이트 2는 5 초과의 pH에서 발생하는 전역 최소값을 가지며 덱스트란 설페이트 1 및 3은 20mV 미만의 델타 값을 갖는다. 덱스트란 설페이트 4 내지 7로 코팅된 본 발명의 고체 물체는 이러한 기준을 충족한다.

[0582] 0.25 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 3, 4 및 5를 사용한 PVC 코팅된 튜빙(실시예 1.6, 1.13 및 1.18에 해당함)의 제타 전위를 도 9에 나타낸다.

[0583] 0.25 M NaCl에서 덱스트란 설페이트 3, 6 및 7을 사용한 PVC 코팅된 튜빙(실시예 1.6, 1.25 및 1.31에 해당함)의 제타 전위를 도 10에 나타낸다.

[0584] **실시예 4b: 다양한 농도에서 상이한 염과 함께 덱스트란 설페이트 5를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 제타 전위 측정**

[0585] 다양한 농도에서 NaCl, Na_2HPO_4 또는 Na_2SO_4를 사용하여 실시예 1.18, 1.22, 1.39-1.42 및 1.44-1.45(모두 덱스트란 설페이트 5)에 따라 코팅된 PVC 튜빙의 표면 전하를 평가 방법 D에서 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0586] 상이한 NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위 값을 표 12에 나타낸다.

표 12

상이한 NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위

실시예 번호	염 농도 [M]	델타 값 [mV]	pH (전역 최소값)	IEP
1.18	0.25	38	4.5	2.4
1.22	1.7	28	4.5	2.5

[0587]

[0588] 0.25 M 및 1.7 M의 NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙(실시예 1.18 및 1.22에 해당함)의 제타 전위 프로파일을 도 11에 나타내며, 여기서 제타 전위에 대한 염 효과는 명백하다. 바람직한 특징(즉, 상술한 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 전위 핑거프린트)은 0.25 및 1.7 M NaCl 농도에서 충족된다.

[0589] 상이한 Na_2HPO_4 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위 값을 표 13에 나타낸다.

표 13

상이한 Na_2HPO_4 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위

실시예 번호	염 농도 [M]	델타 값 [mV]	pH (전역 최소값)	IEP
1.39	0.05	20	4.2	2.6
1.40	0.25	28	4.3	2.4
1.41	0.85	41	4.5	2.6
1.42	1.70	38	4.2	2.7

[0590]

[0591] 0.25 M, 0.85M 및 1.7 M의 Na_2HPO_4 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙(실시예 1.40, 1.41 및 1.42에 해당함)의 제타 전위 프로파일을 도 12에 나타내며 여기서 모든 바람직한 특징(즉, 상술한 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 전위 핑거프린트)은 상이한 농도에서 Na_2HPO_4를 사용하여 충족되는 것임을 알 수 있다.

[0592] 상이한 Na_2SO_4 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위 값을 표 14에 나타낸다.

표 14

상이한 Na_2SO_4 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙의 제타 전위

실시예 번호	염 농도 [M]	델타 값 [mV]	pH (전역 최소값)	IEP
1.44	0.25	40	4.5	2.6
1.45	0.85	39	4.3	2.6
N/A**	1.7	*	*	*

*1.7 M에서 물에 용해되지 않음
**N/A = 해당 없음

[0593]

[0594] 0.25 M 및 0.85 M의 Na_2SO_4 농도에서 덱스트란 설페이트 5로 PVC 코팅된 튜빙(실시예 1.44 및 1.45에 해당함)의 제타 전위 프로파일을 도 13에 나타내며 여기서 모든 바람직한 특징(즉, 상술한 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 전위 핑거프린트)은 상이한 농도에서 Na_2SO_4농도를 사용하여 충족되는 것임을 알 수 있다. 상이한 농도에서 상이한 유형의 염을 사용하는 것이 제타 전위 프로필에 유의한 영향을 주지 않을 것임은 표 12, 13 및 14로부터 명백하다. 또한 상이한 염 유형에 대하여 염 의존성이 있음은 자명하다.

[0595] **실시예 5: 다양한 NaCl 농도에서 상이한 덱스트란 설페이트를 사용하여 코팅된 PVC 튜빙의 혈액 접촉 활성화(혈소판 손실 및 F1 + 2)**

[0596] 다양한 NaCl 농도에서 실시예 1.1, 1.3, 1.13, 1.18, 1.25 및 1.31(덱스트란 설페이트 1, 2, 4, 5, 6 및 7에 해당함)에 따라 코팅된 PVC 튜빙의 혈액 노출 후 보존된 혈소판 및 F1 + 2(프로트롬빈 단편)의 백분율을 각기 평가 방법 E 및 F에서 명시된 바와 같이 측정하였다.

[0597] 결과를 표 15와 도 14 및 도 15(0.25 M NaCl 농도) 그리고 표 16과 도 16 및 도 17(1.7 M NaCl 농도)에 나타낸다.

[0598] 표 및 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 0.25 M 및 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4, 5, 6 및 7로 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체에 대해 유의한 혈소판 손실(혈전증을 나타내는 혈소판 손실)은 관찰되지 않았다. 코팅의 혈전저항 성질은 동일한 덱스트란 설페이트에 대해 관찰된 낮은 F1 + 2 값(프로트롬빈 단편)에 의해 더 확인되었다. 50kDa의 분자량을 갖는 비교 덱스트란 설페이트 1 및 100kDa의 분자량을 갖는 비교 덱스트란 설페이트 2로 코팅된 튜빙은 또한 덱스트란 설페이트 4-7로 코팅된 본 발명의 고체 물체와 비교하여 유의한 혈전증 및 높은 프로트롬빈 단편 생성을 나타내었다.

[0599] 비코팅된 PVC 튜빙 및 응고 예는 이 실험에서 유의한 혈전증을 나타낸다.

표 15

0.25 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 1, 2, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙의 보존된 혈소판(%) 및 F1 + 2(pmol/L)

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	보존된 혈소판[%]	F1+2 [pmol/L]	N (수 평균)
1.1	1 (참고예 덱스트란 설페이트)	53	15868	2
1.3	2 (참고예 덱스트란 설페이트)	0	186405	1
1.13	4	93	741	1
1.18	5	96	791	1
1.25	6	99	854	2
1.31	7	97	1237	2
비코팅된 PVC 예	-	2	637658	-
응고예	-	1	644465	-

[0600]

표 16

1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 1, 4, 5, 6 및 7로 코팅된 PVC 튜빙의 보존된 혈소판(%) 및 F1 + 2(pmol/L)

실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	보존된 혈소판[%]	F1+2 [pmol/L]	N (수 평균)
1.2	1 (참고예 덱스트란 설페이트)	27	248469	2
1.15	4 (참고예 덱스트란 설페이트)	97	2057	2
1.22	5	90	3609	3
1.27	6	92	2734	1
1.35	7	86	3112	1
비코팅된 PVC 예	-	2	637658	-
음고예	-	1	644465	-

[0601]

[0602] **실시예 6: 다양한 염 농도에서 상이한 덱스트란 설페이트를 사용하여 코팅된 PVC 및 PUR 튜빙 및 강철 쿠폰의 톨루이딘 블루 염색**

[0603] 실시예 1.1-1.55에 따라 코팅된 PVC 및 PUR 튜빙 및 강철 쿠폰은 평가 방법 C에서 명시된 바와 같이 톨루이딘 블루 염색 시험을 하였다.

[0604] 종점 기능화된 헤파린의 공유 결합을 나타내는 블루/바이올렛 색상이 튜빙의 내강 표면 및 강철 쿠폰 상에서 관찰되었다. 본 발명의 방법에 따라 코팅된 시험된 고체 물체에 대해 수득된 균일한 염색은 상이한 고체 물체에 대해 상이한 염 농도에서 상이한 덱스트란 설페이트를 사용하여 수득될 수 있는 균일한 코팅(특히 균일한 헤파린 분포)의 형성을 나타낸다.

[0605] **실시예 7: 온도 및 습도 시험 후의 코팅된 PVC 튜빙의 혈액 접촉 활성화(혈소판 손실 및 F1 + 2)**

[0606] 다양한 NaCl 농도에서 실시예 1.13, 1.15, 1.22 및 1.35(덱스트란 설페이트 4, 5 및 7에 해당함)에 따라 코팅된 PVC 튜빙을 평가 방법 E(보존된 혈소판) 및 F (F1+2)에 따라 평가하기 전에 상승된 온도 및 상대 습도(40℃, 50 % RH, 1주, 평가 방법 K에 따름)에 노출시켰다. 결과를 표 17과 도 18 및 도 19, 그리고 표 18과 도 20 및 도 21에 나타낸다.

[0607] 표 및 도면에서 알 수 있는 바와 같이, 덱스트란 설페이트 4, 5 및 7을 사용하여 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체의 경우, 상승된 온도 및 습도에 노출된 후 보존된 혈소판 및 F1+2 값에 유의한 변화는 없다. 0.25 M 및 1.7 M NaCl 농도에서 제조된 덱스트란 설페이트 4, 5 및 7을 사용하여 본 발명의 방법에 따라 코팅된 고체 물체에 대해서도 유사한 결과가 얻어졌다.

[0608] 이러한 결과는 본 발명의 방법에 따라 제조된 코팅된 고체 물체의 혈전저항 성질이 상승된 온도 및 습도에서와 같이 엄격한 조건에 노출되었음에도 불구하고 유지된다는 것을 입증한다.

표 17

상승된 온도 및 습도에 노출되기 전 및 후의 0.25 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4로 코팅된 PVC 튜빙의 보존된 혈소판(%) 및 F1 + 2(pmol/L)

40℃ 50% RH, 1주 노출	실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	보존된 혈소판[%]	F1+2 [pmol/L]	N (수 평균)
전	1.13	4	93	741	1
후		4	97	1101	1
전	비코팅된 PVC 예	-	2	332748	-
후					
전	응고예	-	1	853981	-
후					

[0609]

표 18

상승된 온도 및 습도에 노출되기 전 및 후의 1.7 M NaCl 농도에서 덱스트란 설페이트 4, 5 및 7로 코팅된 PVC 튜빙의 보존된 혈소판(%) 및 F1 + 2(pmol/L)

40℃ 50% RH, 1주 노출	실시예 번호	덱스트란 설페이트 번호	보존된 혈소판[%]	F1+2 [pmol/L]	N (수 평균)
전	1.15	4	97	2057	2
후		4	91	1435	1
전	1.22	5	90	3609	3
후		5	91	1580	1
전	1.35	7	86	3112	1
후		7	90	3301	1
전	비코팅된 PVC 예	-	1	619778	-
후					
전	응고예	-	2	768361	-
후					

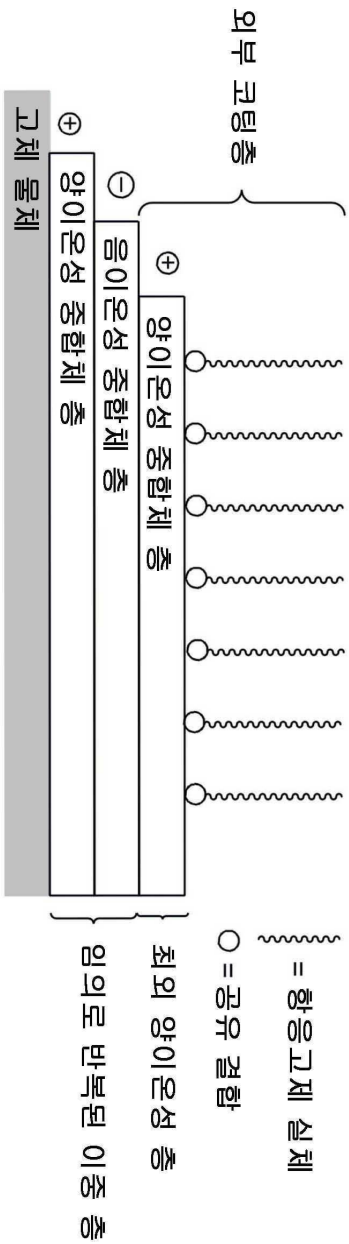
[0610]

[0611] 본원에서 언급된 모든 특허 및 특허 출원은 이의 전체가 참고로 포함된다.

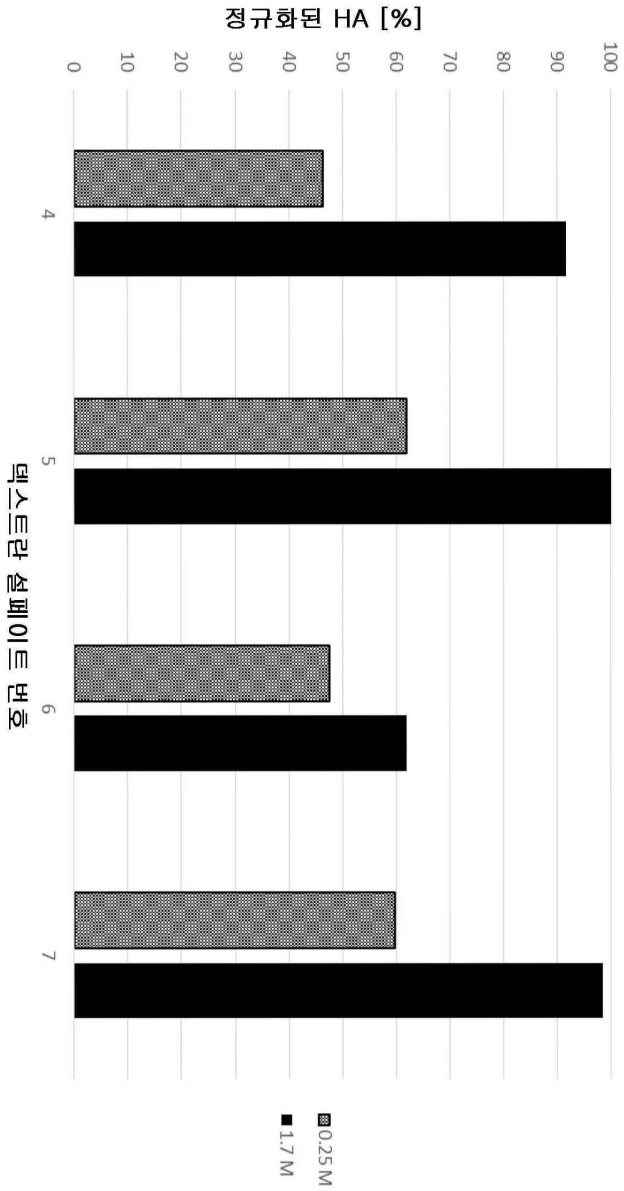
[0612] 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 명세서 및 하기의 청구범위 전체에서, 단어 '포함하다', 및 '포함하는'과 같은 변형은 명시된 정수, 단계, 정수의 군 또는 단계의 군을 포함하는 것을 암시하지만 다른 정수, 단계, 정수의 군 또는 단계의 군은 배제하지 않는 것으로 이해될 것이다.

도면

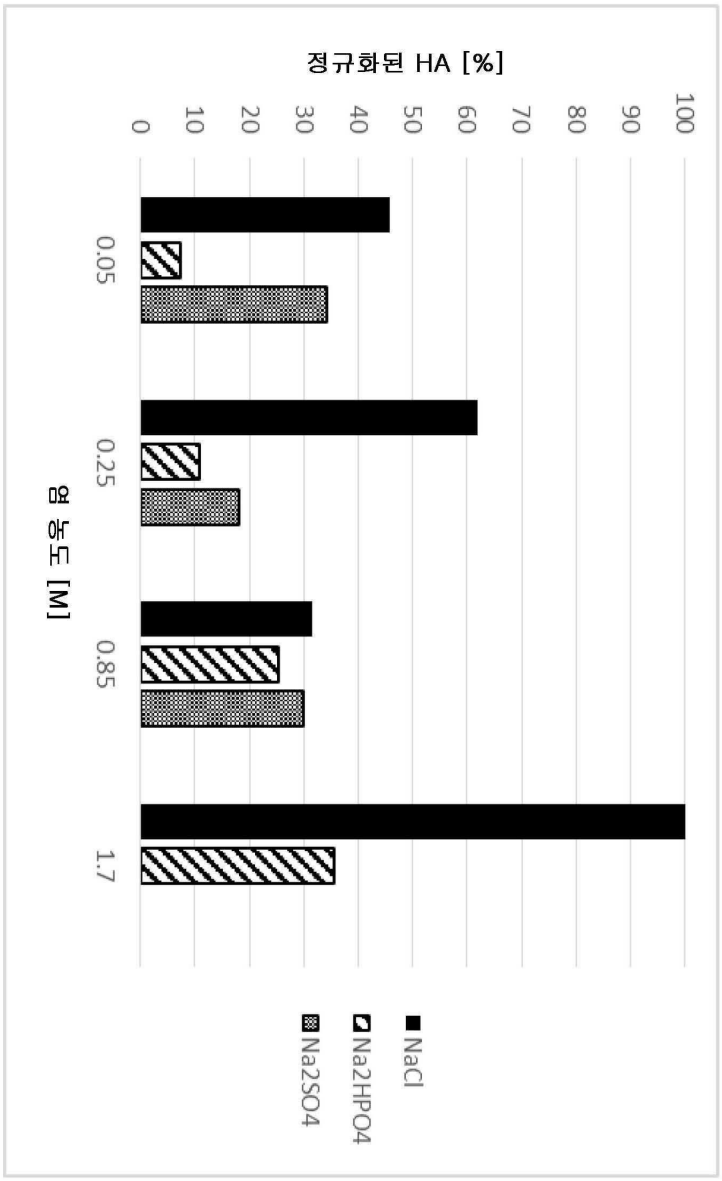
도면1


외부 코팅층
⊕
양이온성 중합체 층
①
음이온성 중합체 층
⊕
양이온성 중합체 층
고체 물체
= 항응고제 실제
○ = 공유 결합
최외 양이온성 층
임의로 반복된 이중 층

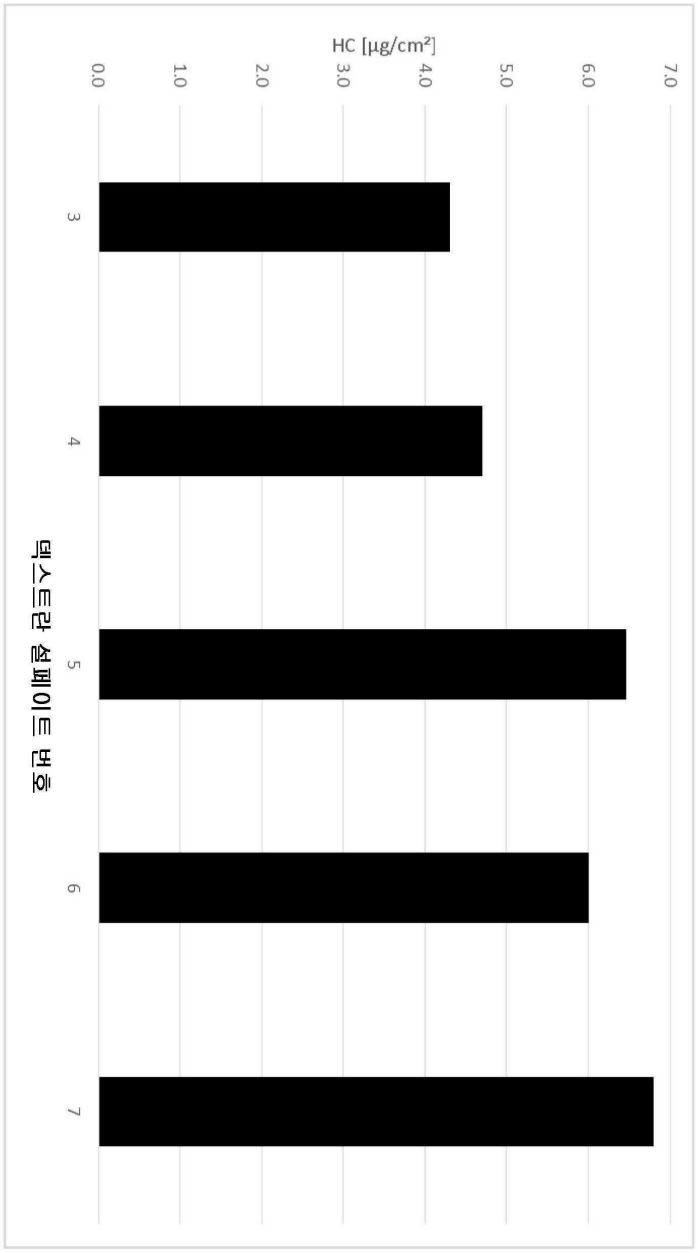
도면2



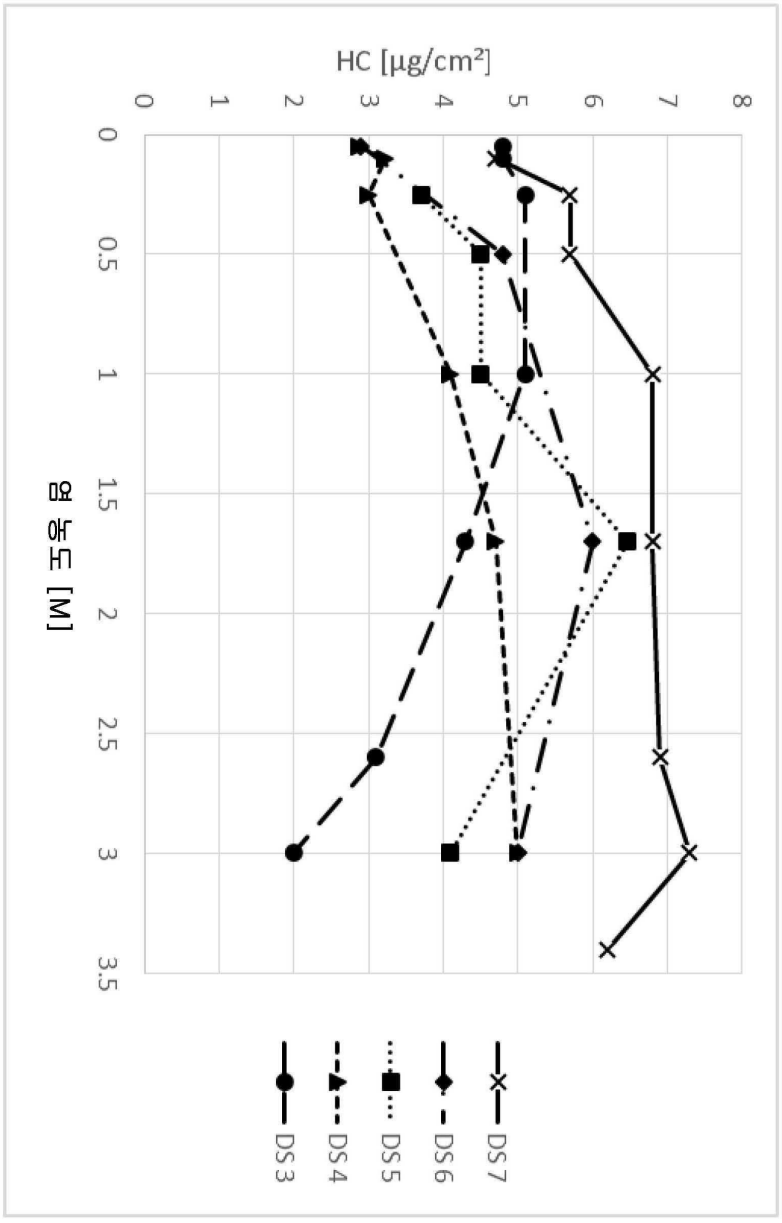
도면3


정규화된 HA [%]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
염 농도 [M]
0.05
0.25
0.85
1.7
NaCl
Na2HPO4
Na2SO4

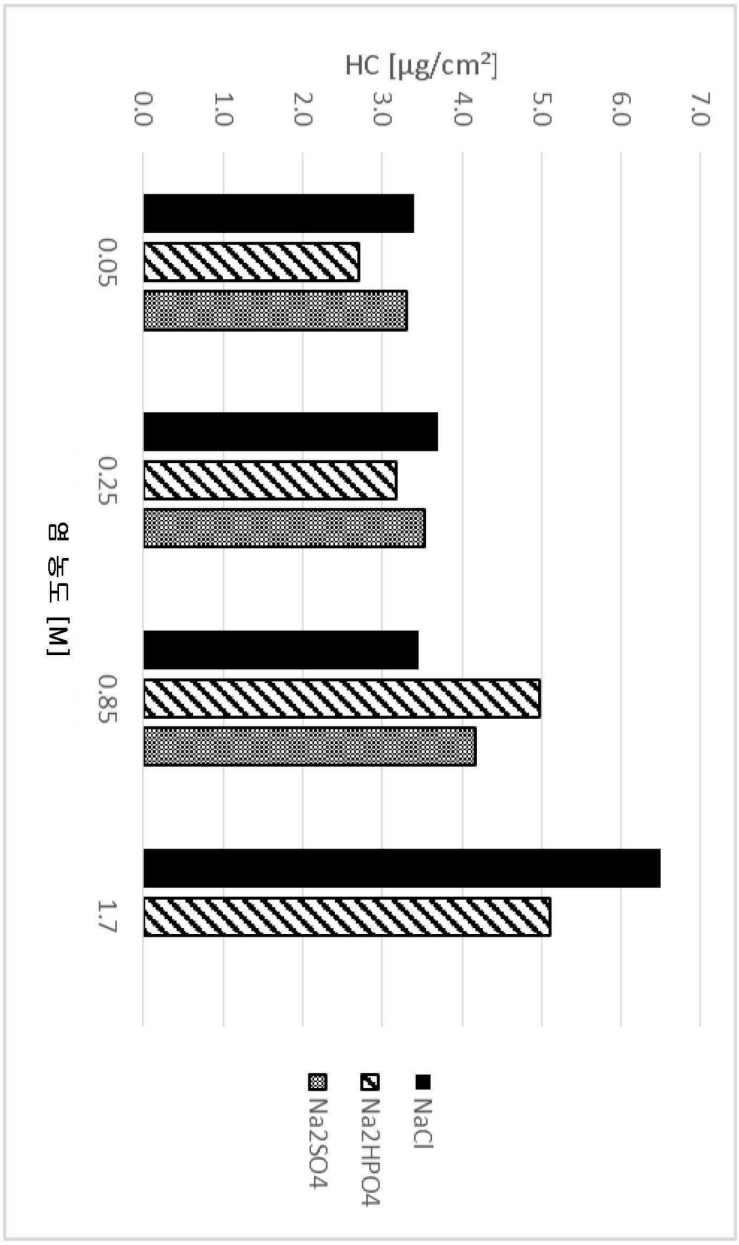
도면4



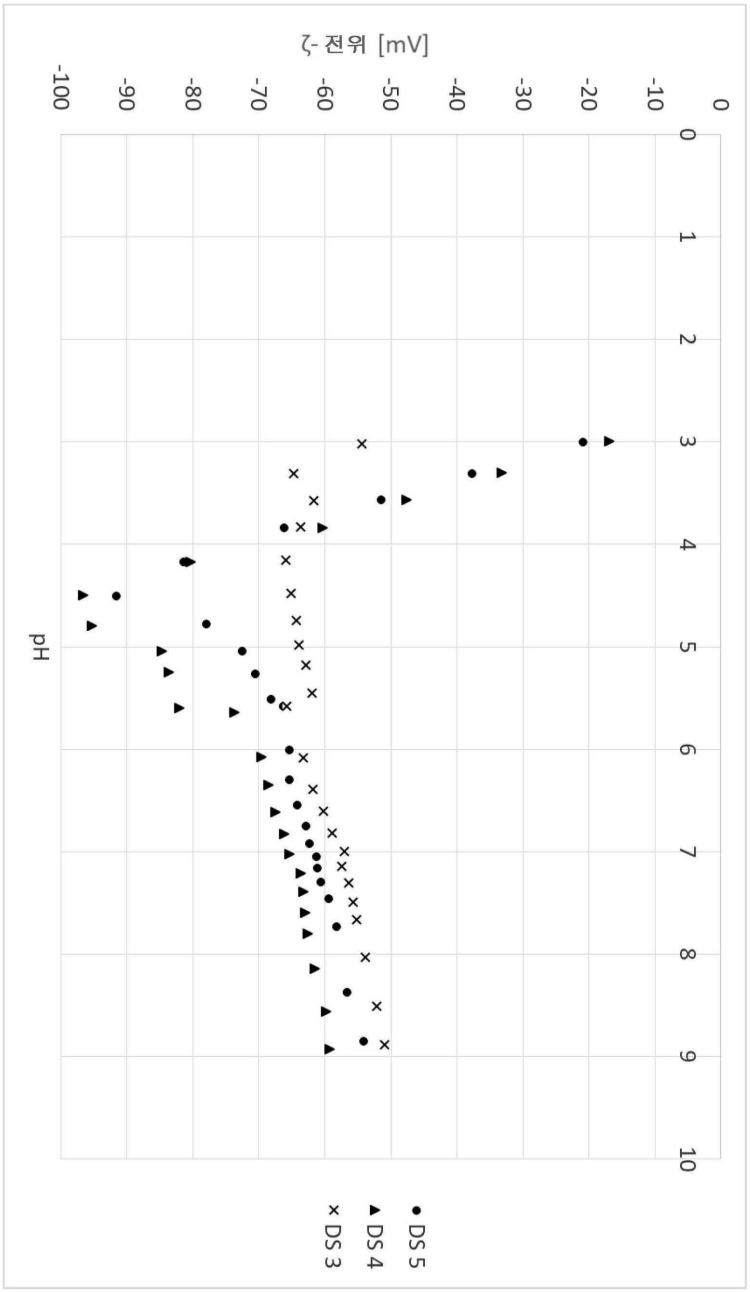
도면5



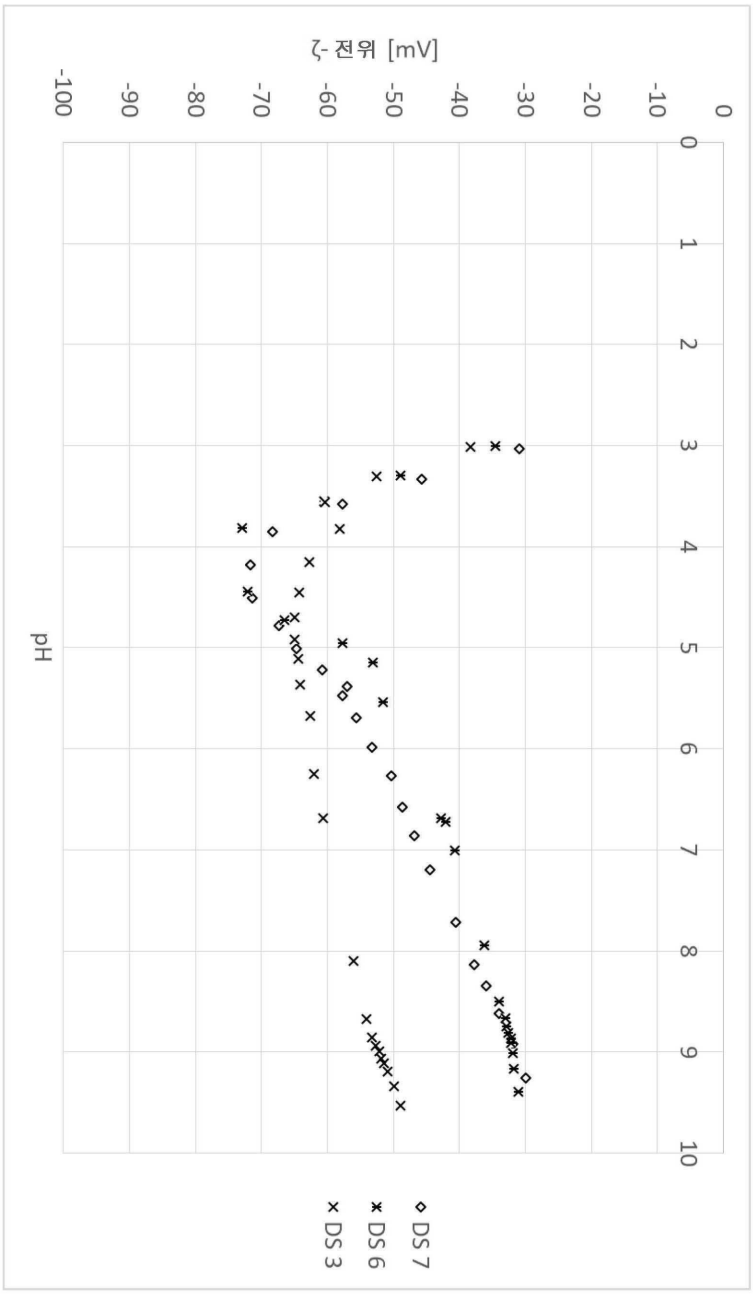
도면6


HC [μg/cm²]
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
0.05
0.25
0.85
1.7
염 농도 [M]
Na2SO4
Na2HPO4
NaCl

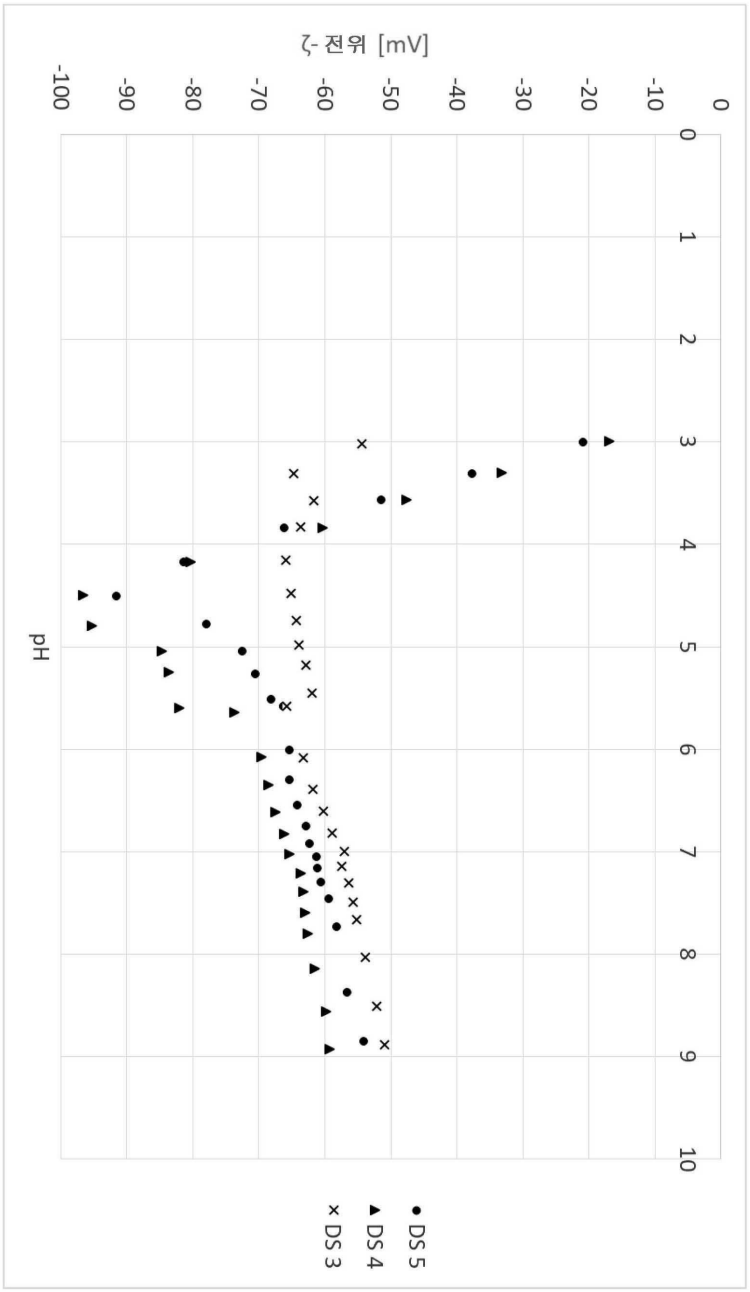
도면7


ζ-전위 [mV]
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
-100
pH
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
DS 5
DS 4
DS 3

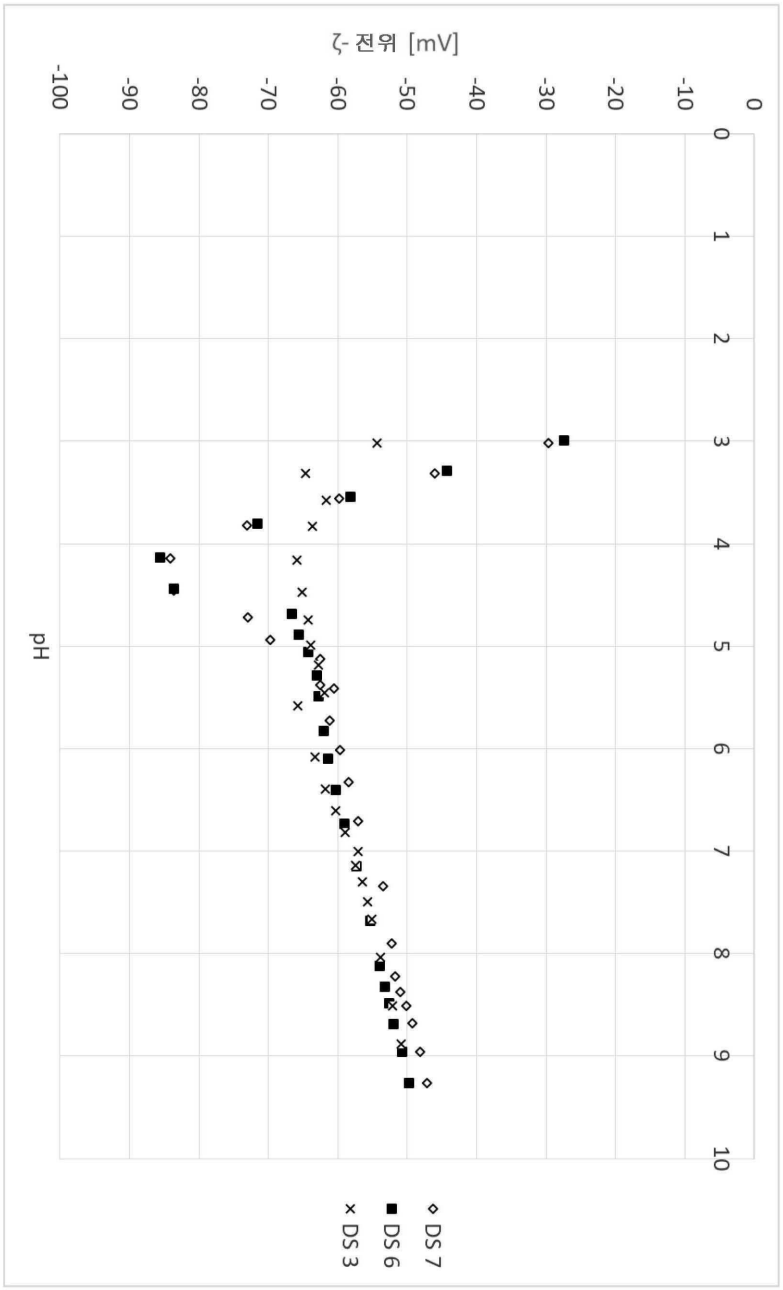
도면8


ζ-전위 [mV]
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
-100
pH
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
DS 7
DS 6
DS 3

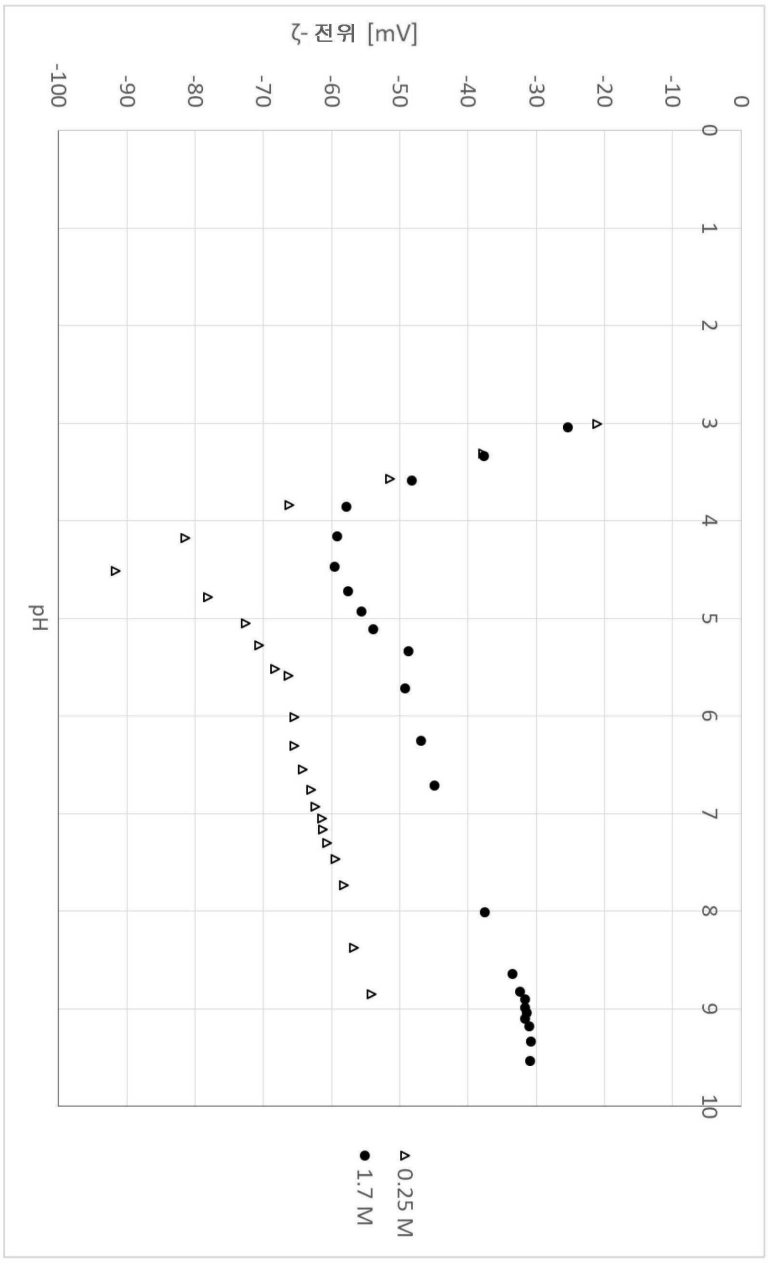
도면9


ζ-전위 [mV]
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
-100
pH
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
DS 5
DS 4
DS 3

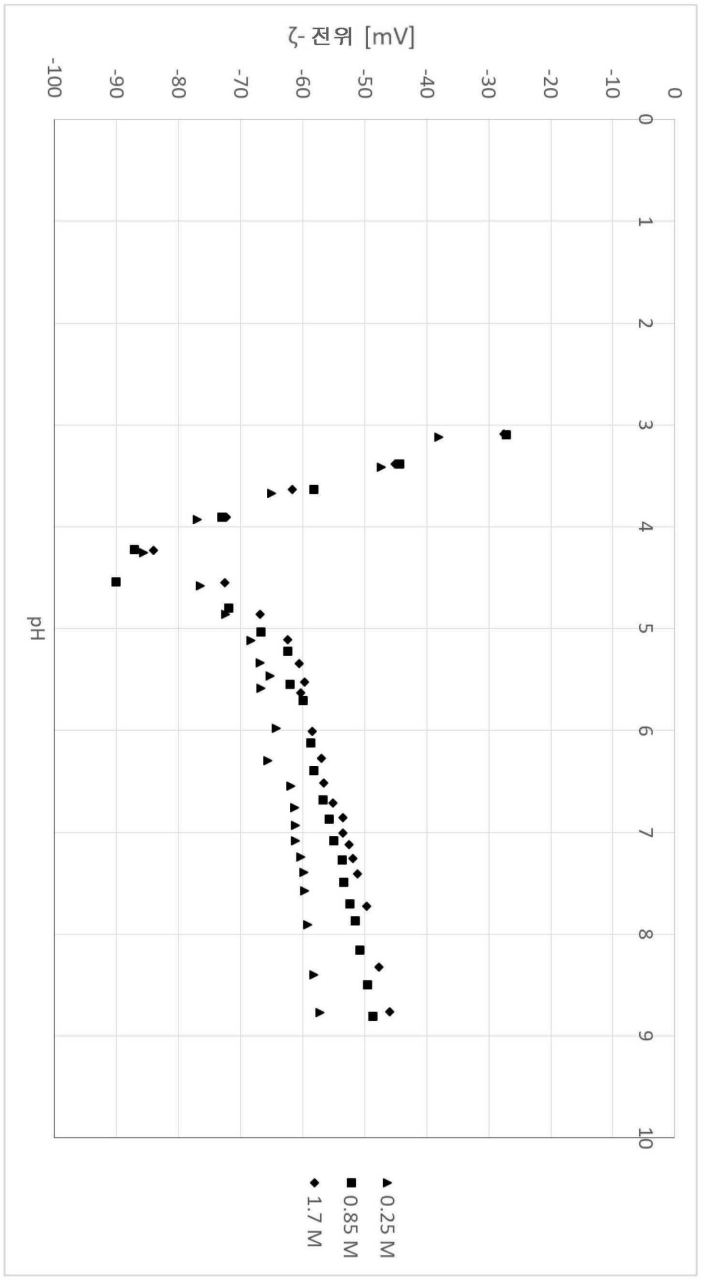
도면10


ζ-전위 [mV]
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
-100
pH
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
DS 7
DS 6
DS 3

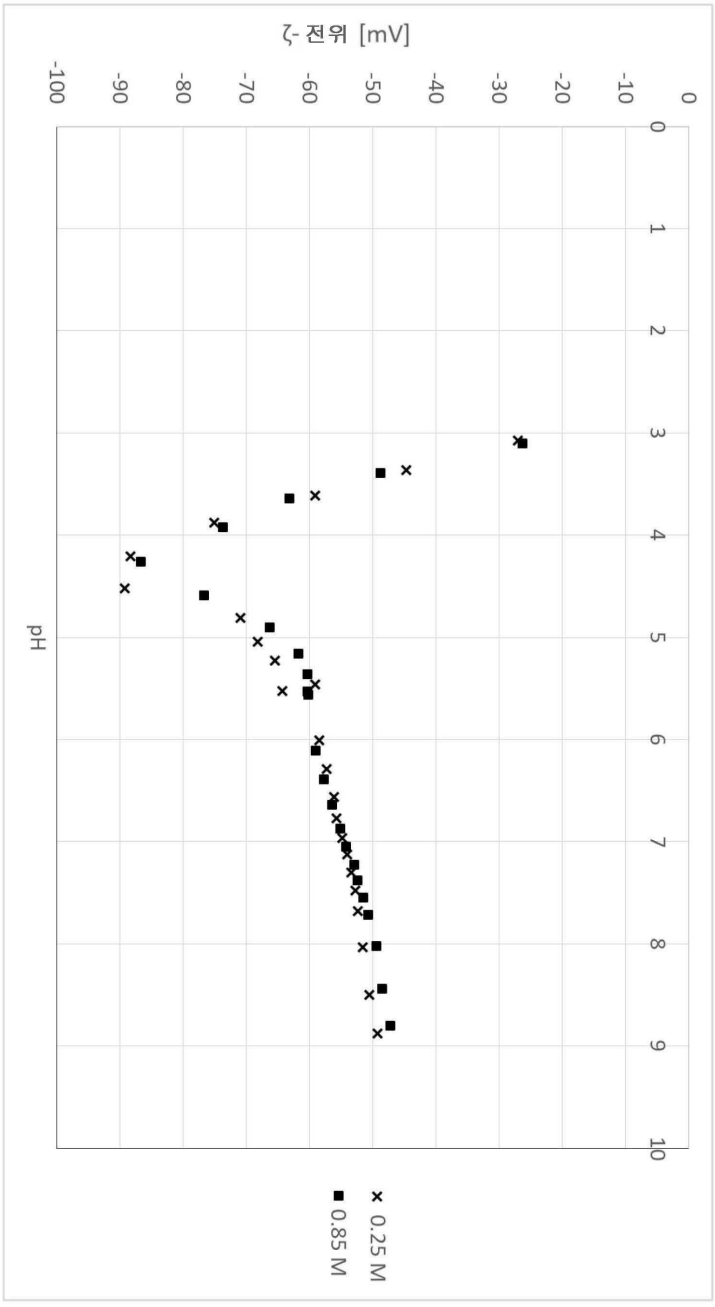
도면11



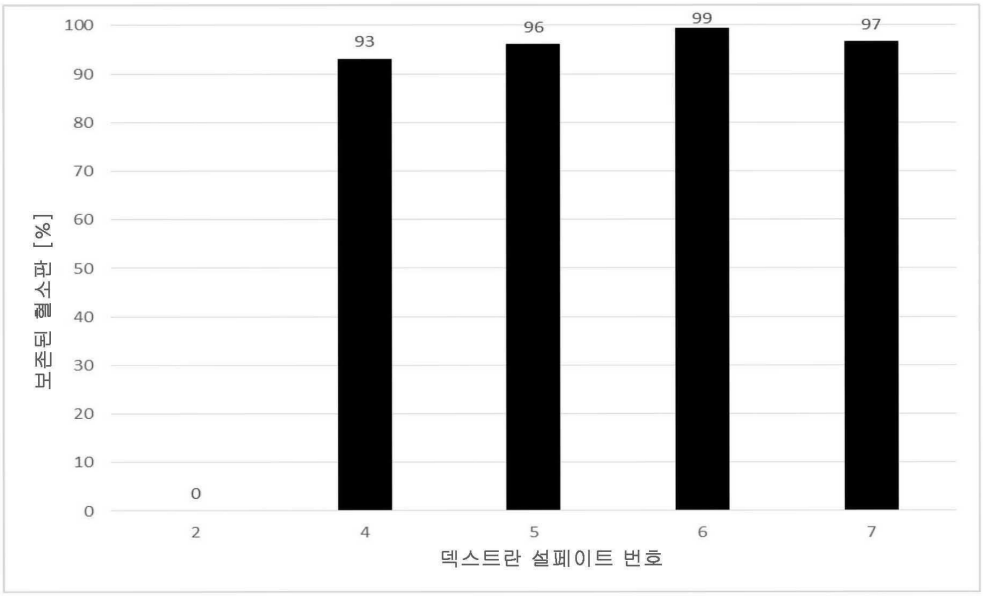
도면12


ζ-전위 [mV]
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
-80
-90
-100
pH
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0.25 M
0.85 M
1.7 M

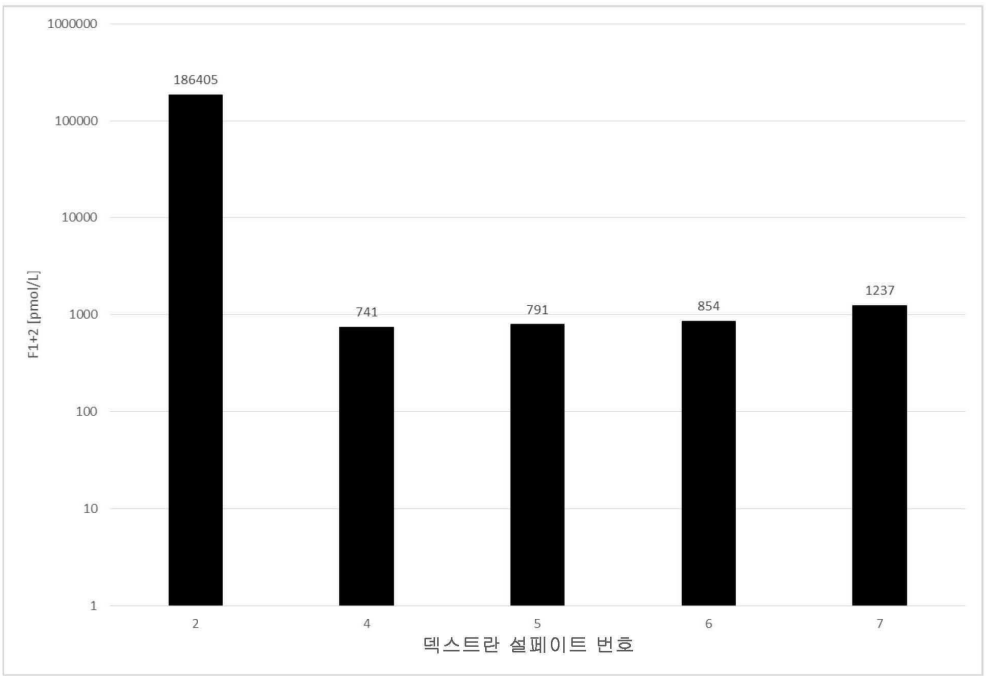
도면13



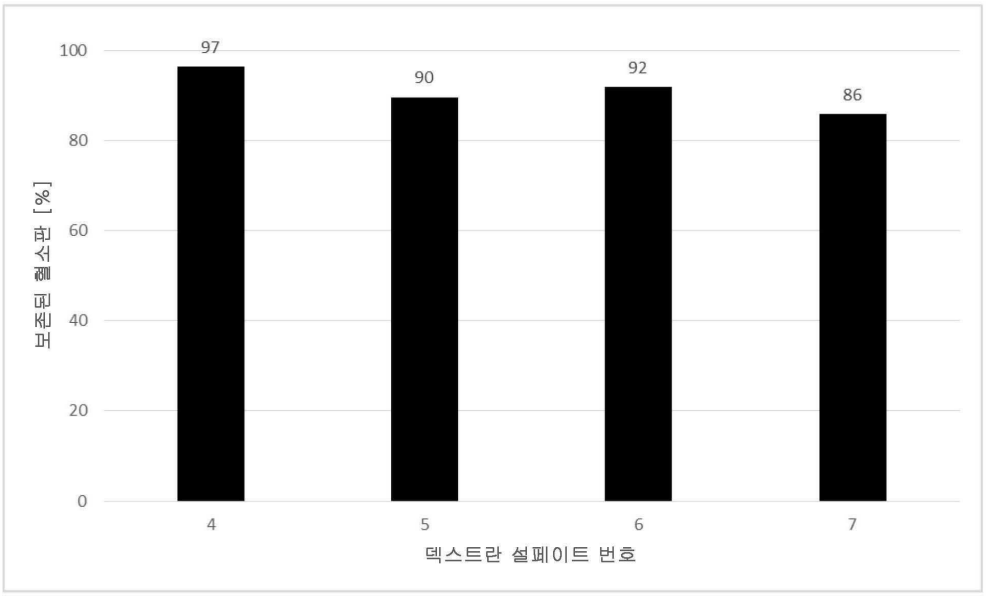
도면14


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
보존된 혈소판 [%]
0
93
96
99
97
2
4
5
6
7
덱스트란 설페이트 번호

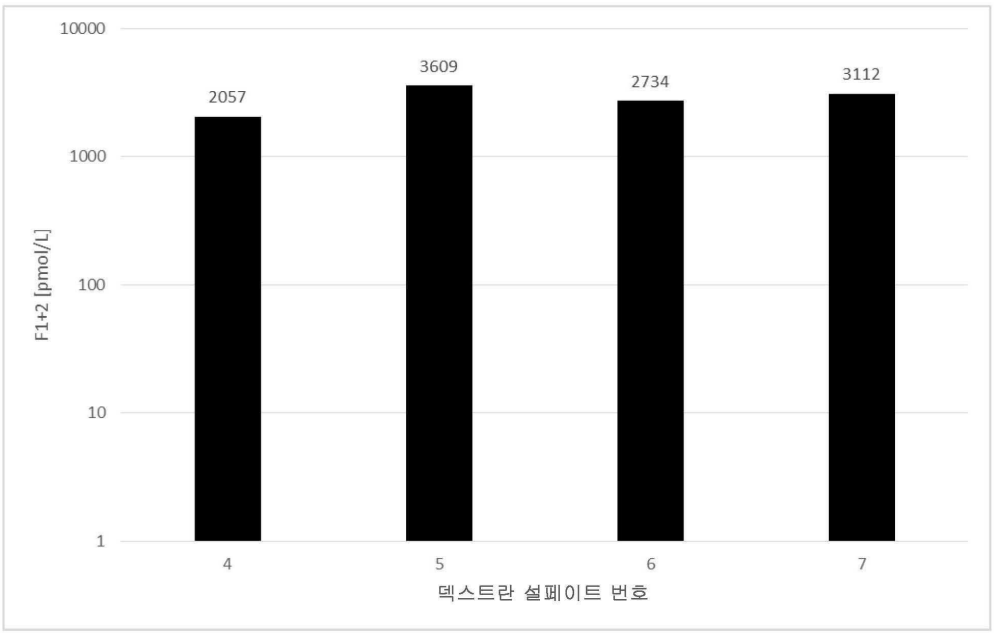
도면15


1000000
100000
10000
1000
100
10
1
F1+2 [pmol/L]
186405
741
791
854
1237
2
4
5
6
7
덱스트란 설페이트 번호

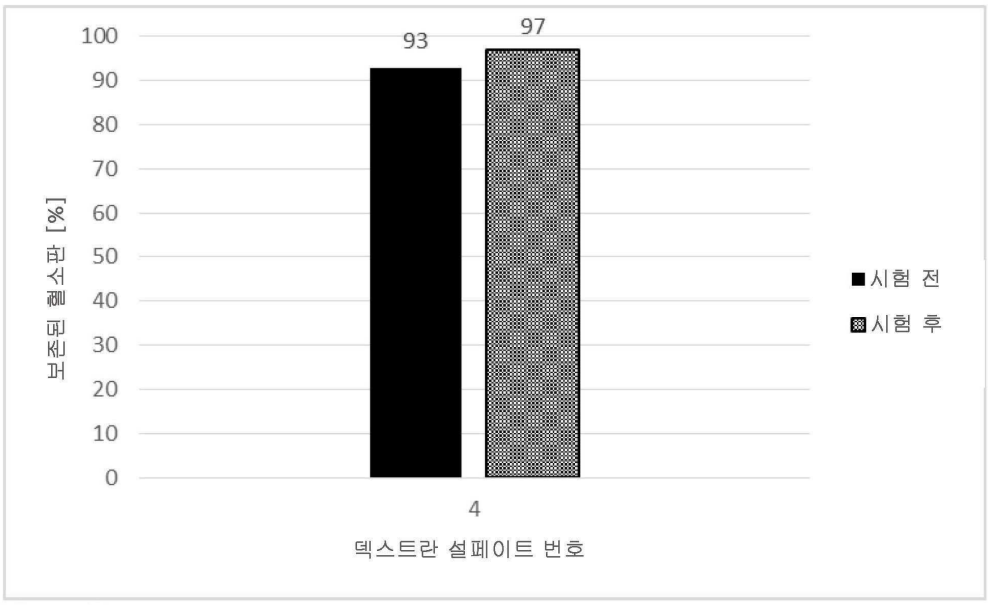
도면16


100
80
60
40
20
0
보존된 혈소판 [%]
97
90
92
86
4
5
6
7
덱스트란 설페이트 번호

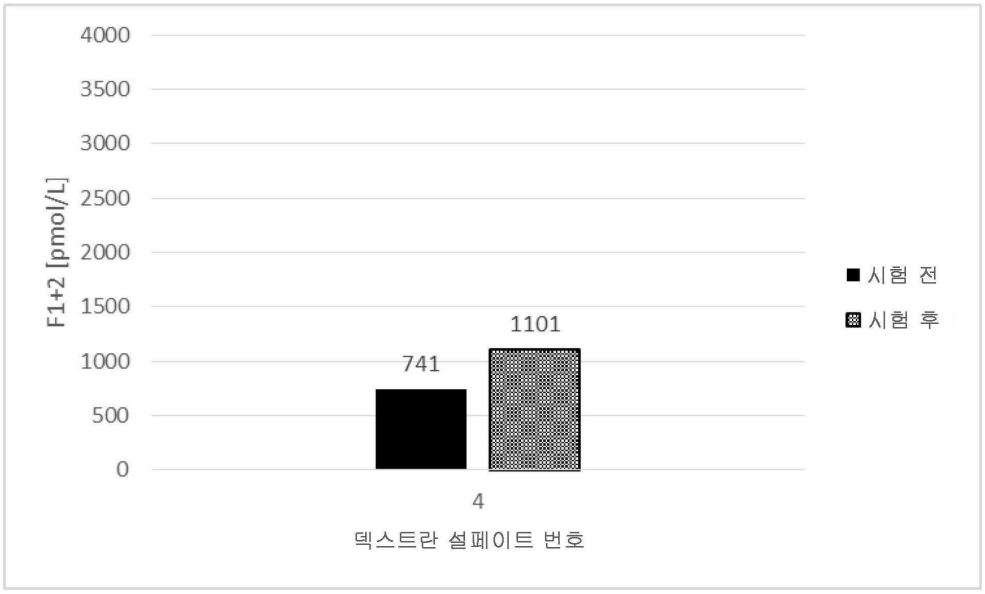
도면17


10000
1000
100
10
1
F1+2 [pmol/L]
2057
3609
2734
3112
4
5
6
7
덱스트란 설페이트 번호

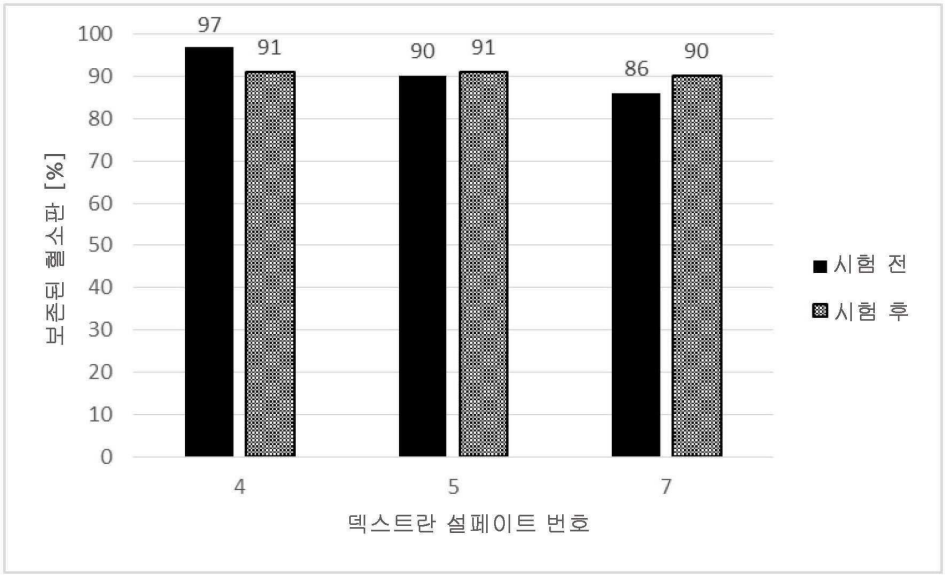
도면18


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
보존된 혈소판 [%]
93
97
4
덱스트란 설페이트 번호
시험 전
시험 후

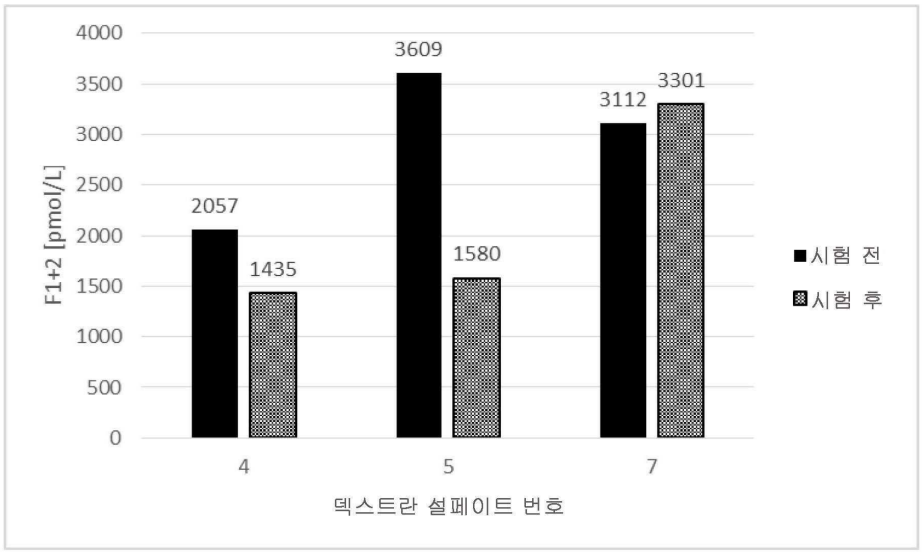
도면19


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
F1+2 [pmol/L]
741
1101
4
덱스트란 설페이트 번호
시험 전
시험 후

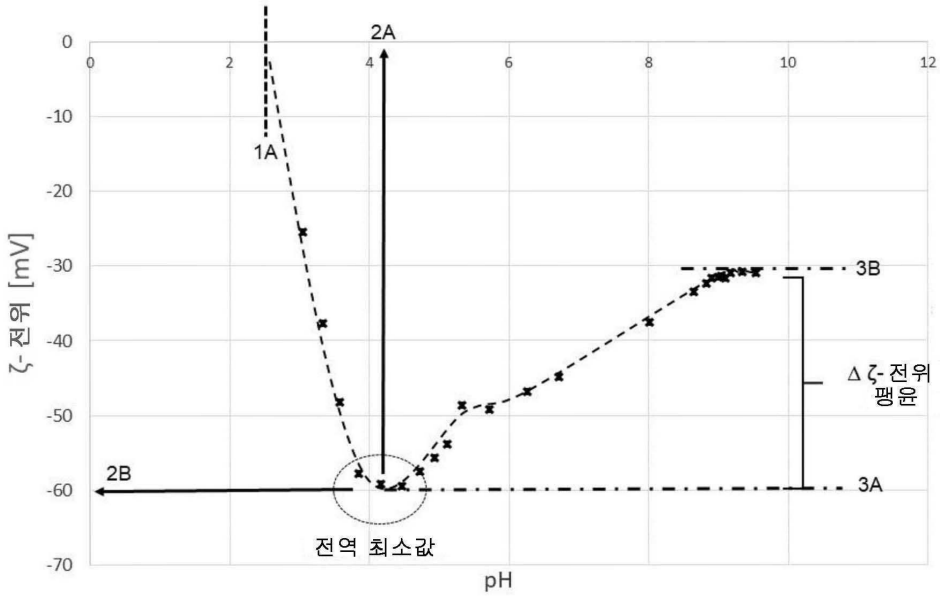
도면20


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
보존된 혈소판 [%]
97
91
90
91
86
90
4
5
7
덱스트란 설페이트 번호
시험 전
시험 후

도면21


4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
F1+2 [pmol/L]
2057
1435
3609
1580
3112
3301
4
5
7
덱스트란 설페이트 번호
시험 전
시험 후

도면22


0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-70
0
2
4
6
8
10
12
ζ-전위 [mV]
pH
1A
2A
2B
3A
3B
Δζ-전위
팽윤
전역 최소값

도면23

