

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 731**

51 Int. Cl.:

A61F 2/00 (2006.01)

A61L 29/16 (2006.01)

A61L 29/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10751217 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2416731**

54 Título: **Dispositivos médicos que contienen nitroprusiato y agentes antimicrobianos**

30 Prioridad:

11.03.2009 US 401829

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.03.2015

73 Titular/es:

**TELEFLEX MEDICAL INCORPORATED (100.0%)
2917 Weck Drive
Durham, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**GUPTA, NISHA;
ROSENBLATT, JOEL y
STEINKE, ELAINE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 530 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivos médicos que contienen nitroprusiato y agentes antimicrobianos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a dispositivos médicos que tienen propiedades biológicas beneficiosas. Más particularmente, la presente invención se refiere a dispositivos médicos que tienen propiedades antitrombógenas y antimicrobianas y un método de producción de los mismos.

10

Antecedentes de la invención

Los catéteres se utilizan actualmente en una gran variedad de procedimientos médicos. Normalmente, estos catéteres están fabricados a partir de polímeros tales como poliuretano, silicona, etc. Es conocido en general que los catéteres venosos centrales usados ampliamente en entornos clínicos desarrollan una vaina de fibrina en el plazo de días desde la inserción en un paciente. Aparte de reducir la función del catéter, pueden producirse trombos relacionados con el catéter. El documento WO 2008/150375 A1 que se refiere a catéteres fibrinolíticos y antimicrobianos combinados aborda también el problema del desarrollo de la vaina de fibrina.

15

20

Estudios por L. J. Ignarro, publicados en el documento Nitric oxide: Biology and Pathobiology, Academic Press, San Diego (2000), indican que las propiedades no trombógenas del endotelio vascular se atribuyen principalmente a la liberación continua de NO (óxido nítrico) por estas células endoteliales al interior de la luz de vasos sanguíneos a un flujo estimado de $0,5$ a $1,0 \times 10^{-10}$ mol cm^{-2} min^{-1} . Se ha propuesto que, imitando la liberación fisiológica de NO, se puede mejorar la biocompatibilidad de los catéteres.

25

El NO es un radical libre sintetizado de forma endógena en el cuerpo humano cuando L-arginina es convertida en L-citrulina por una clase de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas. El NO regula una gama de procesos biológicos cruciales en los aparatos/sistemas cardiovascular, gastrointestinal, genitourinario, respiratorio y nerviosos central y periférico. El descubrimiento de NO como un potente inhibidor de la adhesión y activación plaquetarias, (G.-R Wang et al (1998) Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. PNAS 95: 4888-4893) y su identificación como agente tanto antimicrobiano (S. Carlsson et al (2005) Intravesical nitric oxide delivery for prevention of catheter-associated urinary tract infections. Antimicrobial agents and Chemotherapy 49: 2352-2355; F. C. Fang (1997) Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. J. Clin. Invest. Volumen 99: 2818-2825; y F. C. Fang et al (1997) Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. J. Clin. Invest. 99: 2818-2825) como antiinflamatorio (R. M. Clancy et al (1998) The role of nitric oxide in inflammation and immunity. Arthritis & Rheumatism 41: 1111-1151 y D. Vernet et al (2002) Effect of nitric oxide on the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts in the Peyronie's fibrotic plaque and in its rat model. Nitric Oxide 7: 262-276) han ampliado la investigación sobre NO al campo de los biomateriales.

40

El documento WO 2006/125262 A1 describe un método para regular el desarrollo de una biopelícula exponiendo a la biopelícula a óxido nítrico o al menos un agente de liberación que genera óxido nítrico.

45

Se han utilizado diversas estrategias para otorgar capacidades de liberación de NO en superficies de dispositivos, que incluyen incorporar donadores de NO tales como diazeniodiolatos y nitrosotioles (T. Peters (2006) *Organización Mundial de la Propiedad intelectual (WIPO)* WO06100156 A3 y *Patente Europea* EPO 1704879A 1; J. H. Shin y M. H. Schoenfisch (2006) Improving the biocompatibility of in vivo sensors via nitric oxide release. The Analyst 131: 609-615; M.H. Schoenfisch, K.A. Mowery, M.V. Rader, N. Baliga, J.A. Wahr, M.E. Meyerhoff (2000) Improving the thromboresistivity of chemical sensors via nitric oxide release: Fabrication and in vivo evaluation of NO-releasing oxygen sensing catheters. Anal. Chem. 72: 1 1 19-1126; H.P. Zhang, G.M. Annich, J. Miskulin, K. Osterholzer, S.I. Merz, R.H. Bartlett, M.E. Meyerhoff (2002) Nitric oxide releasing silicone rubbers with improved blood compatibility: preparation, characterization, and in vivo evaluation. Biomaterials 23: 1485-1494; M.C. Frost, S.M. Rudich, H.P. Zhang, M. A. Maraschio, M.E. Meyerhoff (2002) In vivo biocompatibility and analytical performance of intravascular amperometric oxygen sensors prepared with improved nitric oxide-releasing silicone rubber coating. Anal. Chem. 74 (2002) 5942-5947). Sin embargo, estos donadores de NO pueden ser relativamente complicados de sintetizar y pueden requerir, en algunos casos, condiciones de almacenamiento rigurosas. El uso de películas poliméricas dopadas con pequeñas partículas de cobre metálicas como los revestimientos catalíticos sobre la superficie de catéteres sensibles a oxígeno electroquímicos intravasculares también ha sido descrito (Y. Wu et al (2007) Improving blood compatibility of intravascular oxygen sensors via catalytic decomposition of S-nitrosothiols to generate nitric oxide in situ. Sensors and Actuators .5 121: 36-46.). Dichos revestimientos pueden generar NO in situ en interfaces sanguíneas mediante una lenta corrosión de partículas de cobre para producir iones de cobre. Otra estrategia usada ha sido revestir el dispositivo con un revestimiento polimérico con compuesto de nitrosilo organometálico disuelto o dispersado tal como nitroprusiato sódico (SNP), un donador de NO lento (Rosen et al (1998) Medical device with a surface adapted for exposure to a blood stream which is coated with a polymer containing a nitrosyl-containing organometallic compound which releases nitric oxide from the coating to mediate platelet aggregation; Patente de Estados Unidos N° 5.797.887 y Herzog, Jr. et al (2003) Medical device coated with a

65

polymer containing a nitric oxide releasing organometallic nitrosyl compound useful for the prevention of platelet aggregation; Patente de Estados Unidos N° 6.656.217). El nitroprusiato sódico, cuando está en contacto con la sangre, libera NO a niveles fisiológicamente relevantes.

- 5 Además de los trombos relacionados con catéteres, los Centros para el Control de Enfermedades Estadounidense (CDC), estiman que hay de 200.000 a 400.000 episodios de infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéteres (CRBSI) anualmente. Una estrategia utilizada para reducir la incidencia de CRBSI, es el uso de antimicrobianos que han sido incorporados en, o se han usado para revestir, polímeros de catéter. Los catéteres revestidos con antisépticos (D. L. Veenstra et al (1999) Efficacy of Antiseptic-Impregnated Central Venous Catheters in Preventing Catheter- Related Bloodstream Infection- a meta-analysis. JAMA 281: 261-267) o antibióticos (I. Raad et al (1997) Central venous catheters coated with minocycline and rifampin for the prevention of catheter-related colonization and bloodstream infections. A randomized, double-blind trial. The Texas Medical Center Catheter Study Group. Ann Intern. Med. 127: 267-274) han demostrado ser eficaces para rebajar significativamente la incidencia de CRBSI. Sin embargo, no existe ninguna indicación de que estos u otros agentes antimicrobianos serían compatibles con NO o un donador de NO. Al contrario, debido a la naturaleza de radical libre del NO, puede esperarse que éste inactivo o reduzca la actividad de agentes antimicrobianos.

Por consiguiente, es deseable proporcionar un dispositivo médico implantable que tiene una combinación de agente antitrombótico y agente antimicrobiano que es compatible y/o un método de fabricación de un dispositivo médico implantable que tiene una combinación compatible de un agente antitrombótico y un agente antimicrobiano que es capaz de superar las desventajas descritas en el presente documento al menos en cierta medida.

Sumario de la invención

- 25 Las anteriores necesidades son satisfechas, en gran medida, por la presente invención, en la que en un aspecto se proporciona un dispositivo médico implantable que tiene una combinación compatible de un agente antitrombótico y un agente antimicrobiano y un método de fabricación del dispositivo médico.

30 Una realización de la presente invención se refiere a un dispositivo médico que incluye un catéter fabricado mediante un método de acuerdo con la reivindicación 1. El dispositivo médico incluye una superficie que tiene nitroprusiato y un agente antimicrobiano.

35 Otra realización de la presente invención se refiere a un dispositivo médico que incluye un catéter fabricado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones dependientes 2 a 10. El dispositivo médico incluye una estructura configurada para introducción en un sistema vascular de un paciente. La estructura incluye una superficie que tiene nitroprusiato y una sal de clorhexidina de acuerdo con una de las reivindicaciones 3 a 5 o un colorante antimicrobiano de acuerdo con la reivindicación 6 o un agente antimicrobiano de acuerdo con la reivindicación 7 dispuestos sobre ella. El nitroprusiato tiene una concentración suficiente para reducir la trombosis.

40 Otra realización más de la presente invención se refiere a un método de fabricación de un catéter médico. En este método, un material de base se impregna con nitroprusiato, el catéter médico se forma a partir del material de base, y el catéter médico se reviste con un agente antimicrobiano.

45 Se han perfilado, por lo tanto, de forma bastante amplia, algunas realizaciones de la invención para que la descripción detallada de las mismas en el presente documento pueda entenderse mejor, y para que la presente contribución a la técnica pueda apreciarse mejor. Existen, por supuesto, realizaciones adicionales de la invención que se describirán a continuación y que formarán el asunto de las reivindicaciones adjuntas al presente documento.

50 A este respecto, antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y a las disposiciones de los componentes descritas en la siguiente descripción o ilustradas en los dibujos. La invención es capaz de realizaciones además de las descritas y de ser puesta en práctica y realizarse de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleadas en el presente documento, así como el resumen, son para fines de descripción y no deben considerarse limitantes.

55 Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de nitroprusiato sódico sobre la agregación plaquetaria, tal como se mide en resistencia (ohmios) y la activación plaquetaria tal como se mide mediante la cantidad de adenosín trifosfato liberado (nM).

La figura 2 es un gráfico que muestra la generación de óxido nítrico a partir de un revestimiento de nitroprusiato sódico en solitario en comparación con la generación de óxido nítrico a partir de un revestimiento de la combinación de plata y nitroprusiato sódico.

65 La figura 3 es un gráfico que muestra la biodurabilidad de un revestimiento de diacetato de clorhexidina, nitroprusiato sódico y plata, tal como se mide mediante la concentración de óxido nítrico liberado a lo largo del tiempo.

La figura 4 es un gráfico que muestra la biodurabilidad de un revestimiento de nitroprusiato sódico y plata sobre extrusiones de violeta de genciana, tal como se mide mediante la concentración de óxido nítrico liberado a lo largo del tiempo.

5 La figura 5 es un gráfico que muestra la biodurabilidad de un revestimiento de palmitato de clorhexidina, nitroprusiato sódico y violeta de genciana, tal como se mide mediante la concentración de óxido nítrico liberado a lo largo del tiempo.

La figura 6 es un gráfico que muestra la sinergia de nitroprusiato sódico con palmitato de clorhexidina y violeta de genciana contra *Pseudomonas aeruginosa*.

10 Descripción detallada

La invención proporciona métodos de fabricación de dispositivos médicos. En diversas realizaciones, los dispositivos médicos están revestidos o impregnados con nitroprusiato (en lo sucesivo "NP") que funciona como un donador de NO (óxido nítrico). En una forma preferida, el NP incluye nitroprusiato sódico (en lo sucesivo "SNP") una sal sódica de NP. Estos dispositivos médicos son catéteres implantables y, preferentemente, liberan óxido nítrico a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Se ha descubierto un beneficio inesperado, que SNP funciona de forma sinérgica con agentes antimicrobianos tales como clorhexidina, colorantes antimicrobianos y rifampina para proporcionar protección antimicrobiana intensificada especialmente contra patógenos gram negativos que no responden al tratamiento. Ejemplos particulares de colorantes antimicrobianos incluyen violeta de genciana, violeta de metilo, verde brillante, azul de metileno y similares. Tal como se muestra y se describe en el presente documento, el SNP, además de proporcionar un efecto antitrombótico liberando NO, sorprendentemente también tiene un efecto acumulativo o sinérgico cuando está presente en combinación con agentes antisépticos y antibióticos contra bacterias gram negativas que no responden al tratamiento tales como *Pseudomonas aeruginosa*. La inesperada compatibilidad de SNP con agentes antisépticos, antibióticos, metales antimicrobianos, y colorantes utilizados en la fabricación de dispositivos médicos antimicrobianos y la durabilidad de dichas combinaciones en entornos fisiológicos no han sido notificadas previamente.

Además, está dentro del alcance de estas y otras realizaciones de la invención que otros agentes adecuados pueden incorporarse en el material en masa. Los ejemplos de agentes adecuados incluyen otros antibióticos, antisépticos, quimioterapéuticos, péptidos antimicrobianos, miméticos, antitrombóticos, fibrinolíticos, anticoagulantes, agentes antiinflamatorios, agentes analgésicos, agentes antináuseas, vasodilatadores, antiproliferativos, antifibróticos, factores de crecimiento, citoquinas, anticuerpos, péptidos y peptidomiméticos, ácidos nucleicos y/o similares.

35 Los dispositivos médicos adecuados para uso con diversas realizaciones de la invención son catéteres. En diversas realizaciones, el SNP, clorhexidina, rifampina, violeta de genciana y/o similares pueden incorporarse en o sobre todo o parte del dispositivo médico. En un ejemplo particular, el SNP, clorhexidina y violeta de genciana pueden aplicarse en o cerca del área de la punta de un catéter vascular. De esta manera, los constituyentes bioactivos pueden estar localizados en o cerca de la parte del catéter que es más probable que esté en contacto con la sangre y/o los productos sanguíneos.

Formas de clorhexidina adecuadas para uso con realizaciones de la invención incluyen una base de clorhexidina, sales de clorhexidina farmacéuticamente aceptables tales como, por ejemplo, diacetato, laurato (dodecanoato), palmitato (hexadecanoato), miristato (tetradecanoato), estearato (octadecanoato) y/o similares. Además, aunque ejemplos particulares están hechos de una base de clorhexidina, diacetato de clorhexidina, y dodecanoato de clorhexidina, las realizaciones de la invención no están limitadas a forma alguna. En su lugar, tal como se usa en el presente documento, el término, "clorhexidina" se refiere a uno cualquiera o una mezcla de una base de clorhexidina, sales de clorhexidina farmacéuticamente aceptables tales como, por ejemplo, diacetato, dodecanoato, palmitato, miristato, estearato y/o similares. Por ejemplo, otras sales de clorhexidina adecuadas pueden encontrarse en la patente de Estados Unidos nº 6.706.024, titulada Triclosan-Containing Medical Devices, expedida el 16 de marzo de 2004. En general, concentraciones adecuadas de clorhexidina incluyen un intervalo de aproximadamente el 0,1 % peso por peso (p/p) a aproximadamente el 30 % p/p. Más particularmente, un intervalo de clorhexidina adecuado incluye de aproximadamente el 3 % p/p a aproximadamente el 20 % p/p.

55 Los materiales de base adecuados generalmente incluyen materiales elastoméricos y/o poliméricos. Los ejemplos de materiales de base adecuados incluyen poliuretanos, cloruros de polivinilo, termoplásticos tales como, por ejemplo, fluoropolímeros, polímeros de vinilo, poliolefinas, copolímeros y/o similares. El material de base que contiene SNP, clorhexidina, rifampina, violeta de genciana y/u otros agentes bioactivos puede depositarse en capas sobre otro material en masa para fabricar el dispositivo médico. Por ejemplo, el material de base que tiene uno o más constituyentes bioactivos puede coextrudirse con un material en masa para formar capas o regiones en el dispositivo médico.

En los siguientes experimentos, se describe específicamente el uso del polímero de resina Tecoflex®-93 A (Lubrizol, Cleveland, OH). Sin embargo, debe entenderse que cualquier polímero adecuado está dentro del alcance de realizaciones de esta invención. Otros polímeros adecuados incluyen los fabricados por The Lubrizol Corp., Wickliffe, OH 44092, EE. UU., INVISTA S.a, r.l. Wichita, KS 67220, EE. UU., GLS Corp., McHenry, IL 60050, EE. UU., y

Colorite Polymers, Ridgefield, NJ 07657, EE. UU. Además, se describen específicamente diacetato de clorhexidina (George Uhe, Garfield, NJ), dodecanoato de clorhexidina (laurato de clorhexidina o dilaurato de clorhexidina) y palmitato de clorhexidina. Sin embargo, debe entenderse que cualquier clorhexidina o sal de la misma adecuada está dentro del alcance de las realizaciones de la invención. Otras sales de clorhexidina adecuadas incluyen miristato de clorhexidina (tetradecanoato de clorhexidina), palmitato de clorhexidina (hexadecanoato de clorhexidina), estearato de clorhexidina (octadecanoato de clorhexidina), y diversas clorhexidinas más fabricadas por George Uhe Company Inc., Garfield, NJ 07026 EE. UU.

MÉTODOS

EJEMPLO 1: SNP como agente antitrombógeno adecuado - efecto sobre la agregación y la activación plaquetarias

Sangre humana fresca se extrajo en tubos de recogida que contenían citrato sódico al 3,8 %, y se usó en el plazo de 3 horas. Se preparó un suministro al 25 % de SNP fresco (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en solución salina al 0,85 %. 500 µl de sangre se mezclaron con 500 µl de solución salina al 0,85 % caliente y se añadió SNP (al 0,05 %, 0,1 % y 1 %) y se le dejó incubar a 37°C durante 5 minutos con agitación suave. Se añadió reactivo Chromolume de Chronolog y se le dejó incubar durante 2 minutos seguido por adición de adenosín difosfato (ADP) (10 µM) para iniciar la reacción. La agregación plaquetaria se midió en ohmios y la activación mediante liberación de adenosín trifosfato (ATP) (nM) en un agregómetro de plaquetas de Chrono-Log, modelo 700.

La adición de SNP a concentraciones del 0,1-1 % en sangre completa inhibe completamente la agregación y activación plaquetarias de manera dependiente de la dosis, tal como se muestra en la figura 1 mostrando, por lo tanto, a SNP como un agente antitrombógeno adecuado.

EJEMPLO 2: Efecto acumulativo/sinérgico de SNP con otros agentes antimicrobianos contra bacterias patógenas

Preparación del inóculo:

Unas pocas colonias de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se retiraron de cultivos de trabajo secundarios sembrados en placas de Agar de Trypticase de Soja (en lo sucesivo "TSA") con sangre de oveja al 5 % y se añadieron a 10 ml de Caldo de Trypticase de Soja (en lo sucesivo "TSB"). Los viales se agitaron en vórtice durante aproximadamente 30 segundos y se incubaron durante 4 horas en una incubadora con agitador. Después de la incubación, se retiraron y se agitaron en vórtice una vez más. Las densidades ópticas de las suspensiones del inóculo se leyeron a una longitud de onda de 670 nm. Las suspensiones del inóculo se diluyeron posteriormente en caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes estéril (en lo sucesivo "CAMHB") a una concentración final de 1-5 x 10⁶ ufc/ml.

Preparación del fármaco antimicrobiano:

Se disolvió y diluyó SNP en agua desionizada estéril para conseguir concentraciones de trabajo del 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % y 0,1 % en los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos.

Se disolvieron diacetato de clorhexidina (en lo sucesivo "CHA") y violeta de genciana (en lo sucesivo "GV") en agua estéril. Se disolvió rifampina (en lo sucesivo "Rif") en dimetilsulfóxido (en lo sucesivo "DMSO"). Se dispersaron nanopartículas de plata en agua estéril.

Inoculación e incubación de las placas:

Se usó una placa de microvaloración estéril de 96 pocillos para poner a prueba lo siguiente: SNP en solitario y SNP en combinación con CHA, GV, Rif y plata a concentraciones tal como se han indicado anteriormente. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

SNP en solitario:

+90 µl de 2x CAMHB
 +90 µl de PBS
 +10 µl de SNP (20x)
 +10 µl de organismo diluido en 2x CAMHB
 200 µl en total

SNP en combinación:

+90 µl de 2x CAMHB
 +80 µl de PBS
 +10 µl de SNP (20x)

+10 µl de fármaco 2 (20x)
 +10 µl de organismo diluido en 2x CAMHB
 200 µl en total

5 Una vez que todos los pocillos de ensayo habían sido llenados, la tapa de la placa se sustituyó y la placa se insertó en una bolsa Ziplock™ y se selló para reducir la evaporación. Cada placa se incubó sin agitación a 37 °C durante 18-46 horas dependiendo del microorganismo.

Determinación de la concentración inhibidora mínima/fraccional

10 Después de que el tiempo de incubación apropiado se había cumplido, la placa de microvaloración se sacó de la incubadora. La placa se leyó a continuación en un lector de placas de Bio-Tek a una longitud de onda de 670 nm con la tapa retirada.

15 Los resultados de los experimentos muestran que el SNP tiene un efecto acumulativo o sinérgico cuando está presente en combinación con otros agentes antimicrobianos contra *P. aeruginosa*. El resultado más sorprendente es la inesperada sinergia de SNP y plata. Las partículas de nanoplata (por ejemplo, partículas de plata a escala nanométrica) utilizadas en estas pruebas tienen una concentración inhibidora mínima (en lo sucesivo "MIC") del 0,2 % . La concentración inhibidora de las partículas de nanoplata se reduce 100 veces en respuesta a la adición de SNP al 0,2 % y 500 veces en respuesta a la adición de SNP al 0,4 % tal como se muestra en la tabla 1. Análogamente, CHA, GV y Rifampina también tienen concentraciones inhibidoras más bajas cuando se usan en combinación con SNP en comparación con cuando se usan en solitario contra *P. aeruginosa* (tabla 1). La concentración inhibidora de SNP en solitario era del 0,6 %.

25 TABLA 1 - Compatibilidad de SNP en combinación con agentes antimicrobianos contra *Pseudomonas aeruginosa*

SNP (%)	MIC/FIC			
	CHP (PPM)	GV (PPM)	Nanoplata (%)	Rifampina (PPM)
0	4	32	0,2	16
0,2	4	4	0,0016	16
0,4	1	4	0,0004	2-4
0,6	0	0	0	0

EJEMPLO DE REFERENCIA 3: Termoestabilidad de SNP y su sinergia con plata (Ag) para generación de NO intensificada

30 Para determinar si sería posible procesar en fundido el SNP en plástico, SNP se calentó en primer lugar a 145 °C durante 10 minutos. Seguidamente, las soluciones de revestimiento que contienen SNP sin calentar o calentado se usaron para preparar los catéteres que liberan NO. A continuación se revistieron por inmersión extrusiones de Tecothane en soluciones de Tecoflex/THF que contenían SNP al 0,1-1 % (p/v) con o sin el 0,1 % - 1 % (p/v) de nanoplata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Posteriormente, las extrusiones revestidas por inmersión se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se curaron durante 2 h a 70 °C. Las extrusiones revestidas se caracterizaban mediante la liberación de NO sobre un analizador de óxido nítrico (Sievers® 280i fabricado por GE Analytical Instruments, Boulder, CO 80301 EE. UU.). El NO liberado a partir de S-nitrosoglutatión (en lo sucesivo "GSNO"), un donador de NO fisiológico en presencia de solución saturada de cloruro cuproso se usó para generar una curva patrón para cuantificación.

40 Las extrusiones de Tecothane revestidas con SNP calentado (al 1 % p/v) fueron capaces de generar 4-6 nM/cm/min de óxido nítrico, que está en el intervalo fisiológicamente eficaz. Esto indica que el SNP seguía siendo viable a alta temperatura abriendo una gama de procesos a temperatura más elevada (tal como procesamiento en fundido) para la fabricación.

45 Inesperadamente, la presencia de plata con SNP en el revestimiento intensificaba la liberación de NO en más de dos veces, tal como se muestra en la figura 2.

EJEMPLO 4: Efecto de clorhexidina sobre la generación de NO a partir de SNP

50 Se revistieron por inmersión extrusiones de Tecothane en la solución de revestimiento de SNP/Ag con o sin CHA al 3,1 % (p/p), tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 3. Se incubaron segmentos de extrusiones revestidas en plasma humano citratado a 37 °C durante 30 días. El plasma se sustituyó después de cada siete días de incubación. La figura 3 muestra que la presencia de CHA no ponía en peligro la liberación de NO a partir del revestimiento. La figura 3 muestra que la presencia de CHA no ponía en peligro la liberación de NO a partir del
 55 revestimiento de SNP/Ag y el revestimiento sigue siendo viable incluso después de 30 días de empacado en plasma humano a 37°C.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5: Efecto de GV sobre la generación de NO a partir de SNP

Se revistieron por inmersión extrusiones que contenían violeta de genciana al 0,6 % en la solución de SNP con o sin plata, tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 3. Se incubaron segmentos de extrusiones revestidas en plasma humano citratado a 37 °C durante 30 días. El plasma se sustituyó después de cada siete días de incubación. La figura 4 muestra que la presencia de violeta de genciana no interfiere en la liberación de óxido nítrico a partir de SNP en presencia o ausencia de plata.

EJEMPLO 6: Procesabilidad en fundido y biodurabilidad de la combinación de SNP, GV y palmitato de clorhexidina

Resina LMT-Tecothane®-93A de baja temperatura de fusión (Lubrizol, Cleveland, OH) se revistió con una solución de violeta de genciana al 1 % p/p (Yantai, China) y etanol. El disolvente de etanol se eliminó por evaporación en la campana de extracción de humos químicos durante una noche y a continuación se secó a 65 °C y a una presión de 30 pulgadas de mercurio (Hg) (1,04 kilogramos de fuerza por centímetro cuadrado (kgf/cm²)) durante 4 h antes de la extrusión.

Resina Tecoflex®-93A de baja temperatura de fusión, sin revestir o revestida con GV se mezcló con o sin dipalmitato de clorhexidina (en lo sucesivo "CHP") (al 10 % p/p) y nitroprusiato sódico dihidratado (al 1 % p/p) en una bolsa de plástico. La mezcla se vertió en la tolva de una extrusora de tornillo único Randcastle de 5/8" (Randcastle Extrusion Systems, Inc. Cedar Grove, NJ 07009-1255 EE. UU.). La microextrusora se fijó a 7,8 revoluciones por minuto (rpm) para velocidad del tornillo y las temperaturas de la zona del cuerpo cilíndrico se fijaron de 122 °C (251°F) a 154 °C (310°F). Un tubo de 6 French (fr) de tamaño se extrajo de un instrumento BH25 (B&H Tool Company, San Marcos, CA 92078 EE. UU.)

Se incubaron extrusiones con SNP al 1 % y CHP al 10 % o GV al 1 % o ambos en plasma humano citratado a 37 °C durante más de una semana. Las tres formulaciones después de 7 días de empapado en plasma eran capaces de generar NO a niveles necesarios para ser antitrombógenos, tal como se muestra en la figura 5.

EJEMPLO 7: Adherencia bacteriana sobre extrusiones de SNP/GV/CHP

Las adherencias bacterianas sobre segmentos tubulares extrudidos que contienen: 1) SNP al 5 %; 2) GV al 1 % + CHP al 10 %; y 3) GV al 1 % + CHP al 10 % + SNP al 5 % se compararon entre sí. Las extrusiones se realizaron tal como se ha descrito en el ejemplo 6. La última se preparó con CHP al 10 % como diana.

Se cortaron segmentos de un centímetro de largo de cada uno de los tubos extrudidos de SNP al 5 %, GV al 1 % + CHP 10 %, y GV al 1 % + CHP 10 % + SNP al 5 % y se esterilizaron mediante exposición a ultravioleta (UV). Los segmentos se incubaron en plasma humano estéril durante 0, 14 y 27 días. Las muestras de plasma se sustituyeron por plasma fresco después de cada 7 días de incubación. Catéteres ARROWGard blue plus (AGB⁺) con revestimiento de clorhexidina tanto en la superficie interna como en la externa se incluyeron como uno de los controles negativos.

En una placa de microvaloración de 48 pocillos (uno por organismo), los pocillos se llenaron con 900 µl de TSB correspondientes al número predeterminado de pocillos experimentales y de control. Después de que los pocillos se prepararon, se emplearon pinzas estériles para dejar caer un segmento experimental o de control en un pocillo independiente. Seguidamente, se preparó una suspensión de cada organismo.

Ambos organismos de provocación, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se prepararon de la siguiente manera: se retiraron unas pocas colonias de un cultivo de trabajo secundario sembrado sobre TSA con sangre de oveja al 5 % y se añadieron a 10 ml de TSB. Los viales se agitaron en vórtice durante aproximadamente 30 segundos y se incubaron durante 4 horas en una incubadora con agitador. Después de la incubación, los viales se retiraron y se agitaron en vórtice una vez más. La absorbancia bacteriana de cada suspensión de inóculo se leyó a una densidad óptica de 670 nm. Las suspensiones de inóculo se diluyeron a continuación a una concentración final de 1 a 5 x 10⁴ unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml).

Un volumen de 100 µl de la suspensión ajustada se usó para inocular los pocillos de muestra (incluyendo control de AGB⁺) y pocillos de control de crecimiento que dan como resultado 3 log de organismos por pocillo. Todos los pocillos de control negativo recibieron un volumen de 100 µl de TSB. Las placas de microvaloración se sellaron a continuación con Parafilm® alrededor de los bordes para minimizar la evaporación y se incubaron durante 24 horas en una incubadora con agitador ajustada a 37 °C y 100 rpm.

Después de la incubación, se usaron pinzas estériles para retirar cada segmento y para aclararlo en solución salina tamponada con fosfato (en lo sucesivo "PBS"). Cada segmento se aclaró individualmente en una sección independiente de una placa de Petri dividida en tres agitando el segmento sumergido atrás y adelante aproximadamente cinco veces. Después del aclarado, los segmentos se colocaron en otra placa de 48 pocillos, dispuestas como la placa de provocación original, pero que contenían 1 ml de caldo neutralizante Dey/Engley (D/E) estéril por pocillo. Toda la placa de 48 pocillos se colocó en un baño de sonicación (250HT, VWR) y se sonicó

5 durante 20 minutos a aproximadamente 50 °C. Una vez que la sonicación estaba completa, se retiraron 200 µl de cada pocillo y se diluyeron sucesivamente en PBS. A continuación se sembraron 10 µl de cada dilución sobre la superficie de agar neutralizante D/E en placas de 12 pocillos. Las placas se invirtieron e incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las colonias bacterianas resultantes se contaron y se calcularon reducciones logarítmicas de adherencia entre las muestras y los controles de crecimiento.

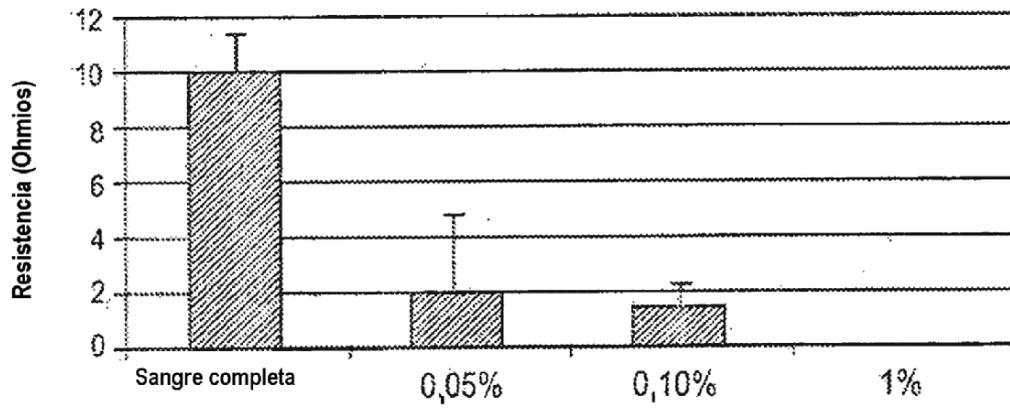
10 La combinación de GV al 1 % + CHP al 10 % podía proporcionar protección contra las bacterias gram positivas, *Staphylococcus aureus* durante hasta 4 semanas pero esta combinación era eficaz contra bacterias gram negativas, *Pseudomonas aeruginosa* solamente durante menos de tres semanas. La adición de SNP al 5 % con la combinación de GV al 1 % y CHP al 10 % prolongaba la protección contra *Pseudomonas aeruginosa* durante más de 4 semanas, tal como se muestra en la figura 6 (nótese que una reducción de 1 log corresponde a una reducción del 90 % en el número de organismos adherentes con respecto a un control tratado; una reducción de 2 log al 99 %; 3 log al 99,9 % etc.).

15 Un beneficio significativo de diversas realizaciones de la invención es la capacidad de fabricar una estructura polimérica cargada de SNP, GV, Ag y/o clorhexidina en una única etapa. Es decir, el procesamiento posterior para introducir agentes antibióticos en la estructura extrudida o moldeada que se realiza durante la fabricación de dispositivos médicos convencionales puede omitirse. Al hacer esto, se puede ahorrar tiempo y dinero.

REIVINDICACIONES

1. Un método de fabricación de un catéter médico, comprendiendo el método:
 - 5 impregnar un material de base con nitroprusiato;
 formar el catéter médico a partir del material de base; y
 revestir el catéter médico con un agente antimicrobiano, en donde el agente antimicrobiano comprende una base
 de clorhexidina y/o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
 - impregnar el material de base con nitroprusiato sódico;
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
 - revestir el catéter médico con diacetato de clorhexidina.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
 - revestir el catéter médico con dodecanoato de clorhexidina.
- 25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
 - revestir el catéter médico con palmitato de clorhexidina.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
 - impregnar el material de base con un colorante antimicrobiano.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye además:
 - revestir el catéter médico con un agente antibiótico.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además:
 - formar una estructura tubular a partir del material de base.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material de base es un polímero.
- 40 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el material de base es un poliuretano.

Efecto de SNP sobre la agregación plaquetaria



Efecto de SNP sobre la activación plaquetaria

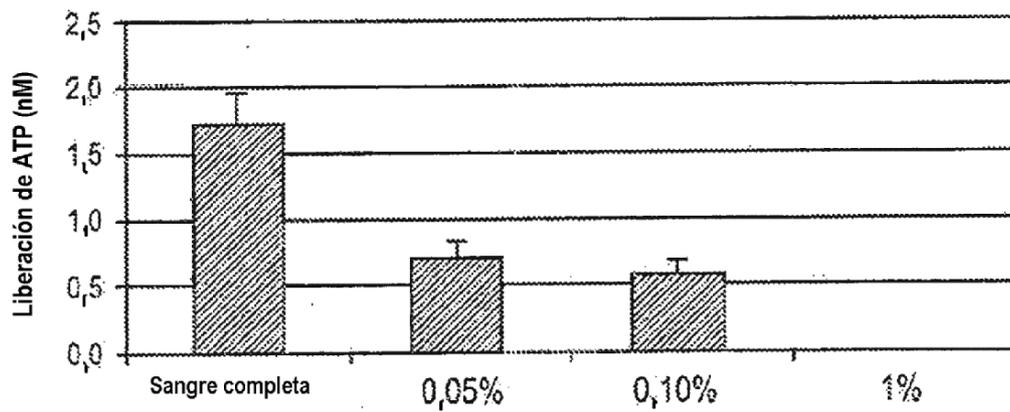


FIG. 1

Efecto de plata sobre la generación de NO a partir de SNP

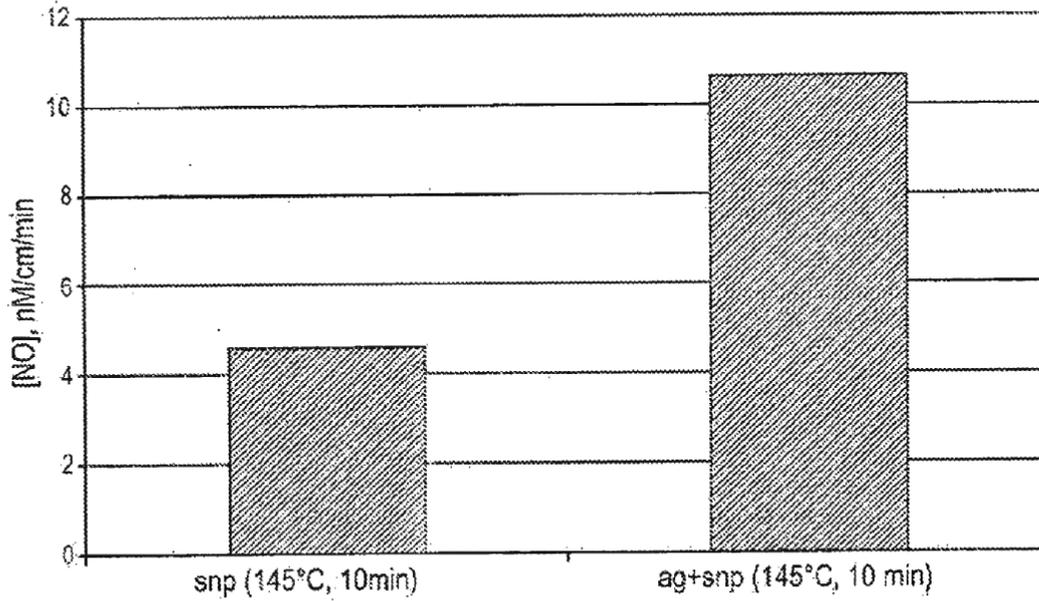


FIG. 2

Biodurabilidad del revestimiento de CHA + SNP + Ag sobre extrusiones de TECOTHANE®

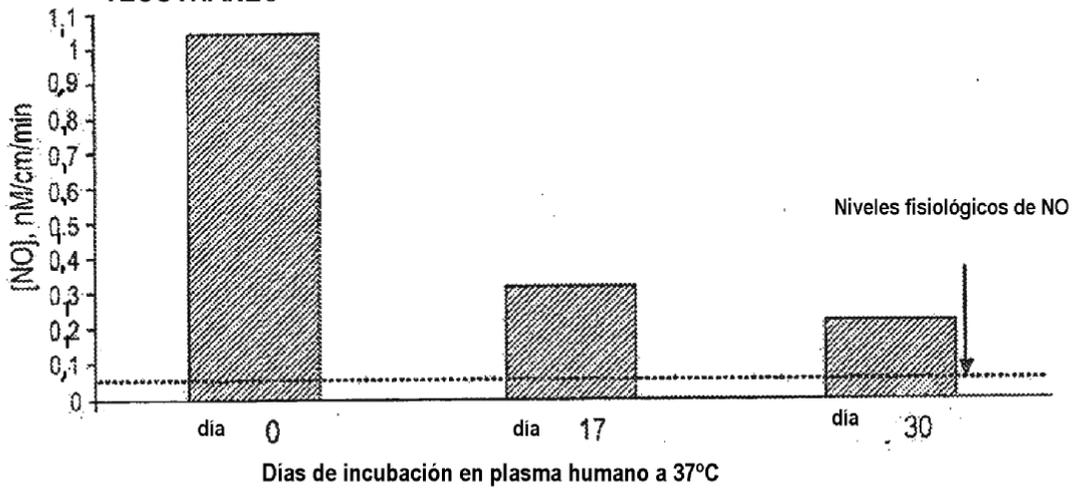


FIG. 3

Biodurabilidad de extrusiones de GV revestidas por inmersión con SNP ± plata

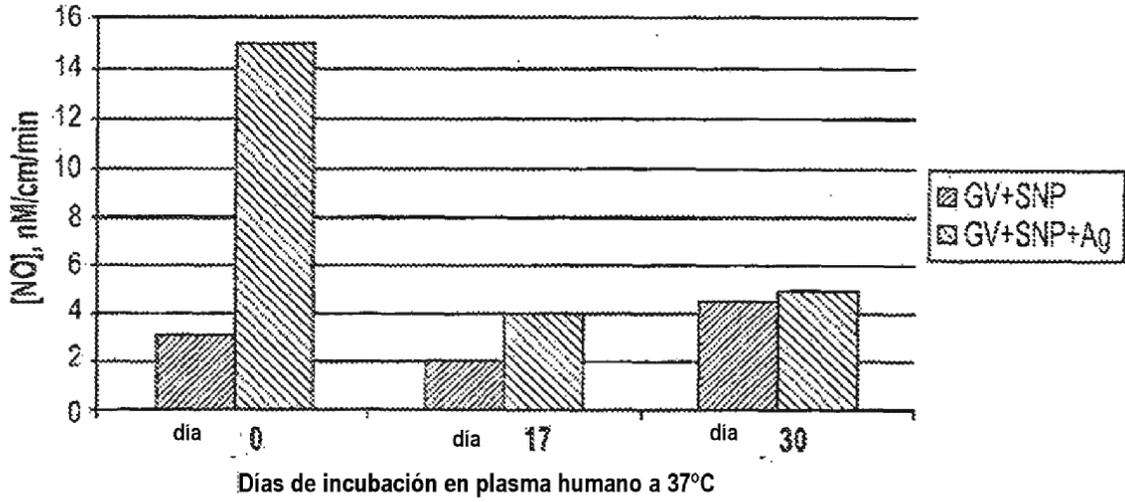


FIG. 4

Biodurabilidad de extrusiones de LMT TECOFLEX® en plasma humano que contiene SNP al 1% ± CHO al 10% ± GV al 1%

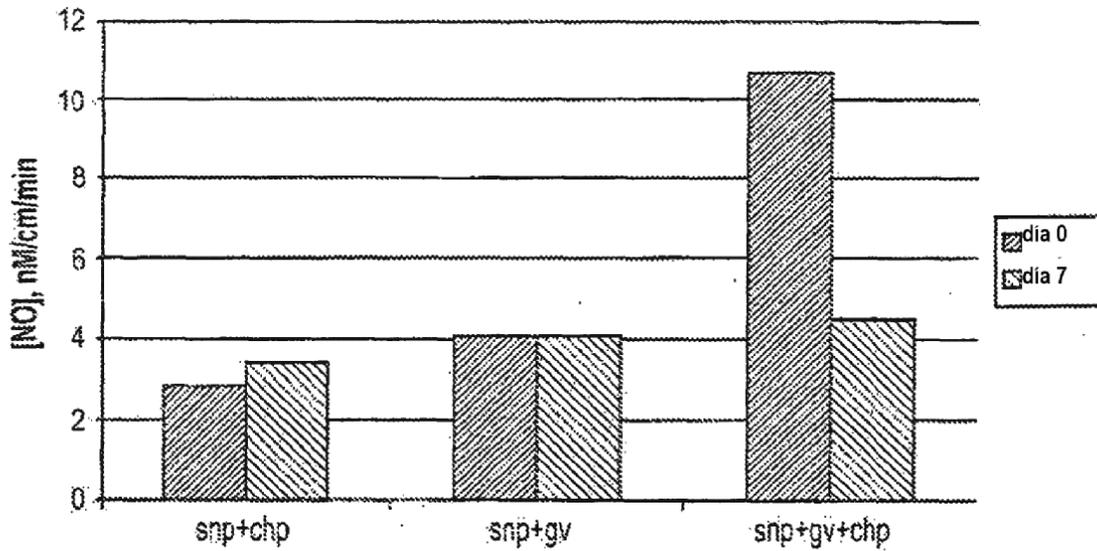


FIG. 5

Efecto de SNP en combinación de clorhexidina y violeta de genciana sobre la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa*

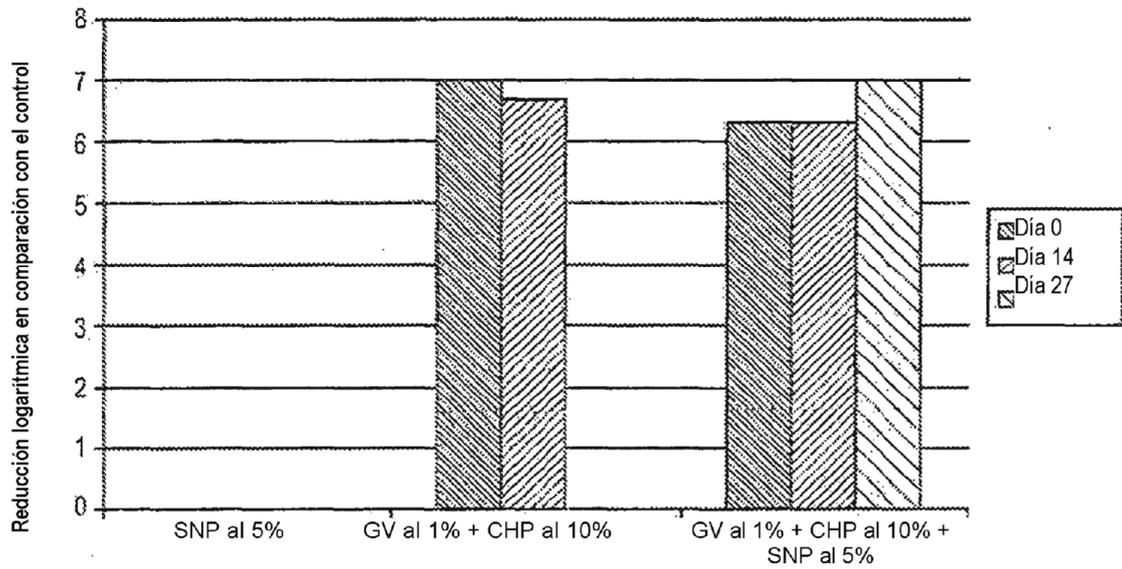


FIG. 6