

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 147**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/34** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

**A61L 31/10** (2006.01)

**A61L 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09783061 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2340057**

54 Título: **Entidades biológicas inmovilizadas**

30 Prioridad:

**15.09.2008 GB 0816783**

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

**04.11.2015**

73 Titular/es:

**CARMEDA AB (100.0%)  
Kanalvägen 3B  
194 61 Upplands Väsby, SE**

72 Inventor/es:

**OSCARSON, STEFAN;  
LAHMANN, MARTINA;  
LEONTEIN, KARIN y  
VESTBERG, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 550 147 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**

Entidades biológicas inmovilizadas.

Esta invención se refiere a entidades biológicas inmovilizadas, superficies, por ej., de productos sanitarios, recubiertas con tales entidades y procedimientos y compuestos intermedios para su producción.

**5 Antecedentes de la invención**

10 Cuando un producto sanitario se pone en el cuerpo, o en contacto con fluidos corporales, surge una serie de reacciones diferentes, dando algunas de ellas como resultado la coagulación de la sangre en contacto con la superficie del dispositivo. Para contrarrestar este serio efecto adverso, el compuesto anticoagulante conocido heparina se ha administrado de manera sistémica durante mucho tiempo a pacientes antes de ponerse en su cuerpo el producto sanitario o cuando está en contacto con sus fluidos corporales, para proporcionar un efecto antitrombótico.

15 La trombina es uno de los diversos factores de coagulación, todos los cuales actúan juntos para dar como resultado la formación de trombos en una superficie en contacto con la sangre. La antitrombina (también conocida como antitrombina III) ("AT") es el inhibidor de la coagulación más prominente. Neutraliza la acción de la trombina y otros factores de la coagulación y así restringe o limita la coagulación de la sangre. La heparina mejora espectacularmente la velocidad a la cual la antitrombina inhibe los factores de coagulación.

20 Sin embargo, el tratamiento sistémico con altas dosis de heparina está asociado con frecuencia a serios efectos secundarios de los cuales la hemorragia es el predominante. Otra complicación rara, pero seria, del tratamiento de heparina es el desarrollo de una respuesta alérgica denominada trombocitopenia inducida por heparina que puede conducir a trombosis (tanto venosa como arterial). El tratamiento con heparina sistémica de alta dosis, por ejemplo, durante cirugía también requiere un control frecuente del tiempo de coagulación activado (usado para controlar y guiar el tratamiento con heparina) y los correspondientes ajustes de la dosis cuando sea necesario.

25 Por lo tanto, se han buscado soluciones en el caso de que la necesidad de una heparinización sistémica del paciente no fuera necesaria o pueda estar limitada. Se pensaba que esto se podía conseguir por una modificación de la superficie de los productos sanitarios usando las propiedades anticoagulantes de la heparina. Así, se ha desarrollado una serie de tecnologías más o menos exitosas en el caso de que una capa de heparina se una a la superficie del producto sanitario que se pretende de ese modo para hacer la superficie no trombogénica. Para dispositivos en los que se requiere bioactividad a largo plazo, la heparina debería ser deseablemente resistente a lixiviación y degradación.

30 La heparina es un polisacárido que soporta grupos sulfato y ácido carboxílico cargados de manera negativa sobre las unidades sacáridas. Se intentó así la unión iónica de heparina a superficies policatiónicas, pero estas modificaciones de la superficie adolecieron de ausencia de estabilidad dando como resultado ausencia de función, a medida que la heparina se lixivaba de la superficie.

35 Se han preparado después diferentes modificaciones de la superficie en las que la heparina se ha unido mediante enlaces covalentes a grupos sobre la superficie.

**Técnica anterior**

40 Uno de los procedimientos más exitosos para hacer un producto sanitario no trombogénico ha sido la unión covalente de un fragmento de heparina a una superficie modificada del dispositivo. El método general y las mejoras del mismo se describen en las patentes europeas: EP-B-0086186, EP-B-0086187, EP-B-0495820 y la patente de EE.UU. 6.461.665.

45 Estas patentes describen la preparación de substratos modificados superficialmente por primero, una escisión selectiva de la cadena polisacárida de heparina, por ejemplo, usando degradación de ácido nitroso, conduciendo a la formación de grupos aldehído terminales. En segundo lugar, la introducción de una o más capas que modifican la superficie soportando grupos amino primario en la superficie del producto sanitario y haciendo reaccionar después los grupos aldehído sobre la cadena polisacárida con los grupos amino sobre las capas que modifican la superficie seguido por una reducción de las bases es Schiff intermedias para formar enlaces amino secundarios estables.

Sin embargo, aún hay un requerimiento de modificaciones de la superficie que sean más fácilmente manipuladas, sean más simples y más eficaces para producir y/o en el caso de que sea mayor la biodisponibilidad del resto heparina.

50 Baskin et al., QSAR Comb. Sci. 26, 2.007, N° 11-12, 1.211 – 1.219 describen el uso de la reacción de las azidas con alquinos para el etiquetado covalente de biomoléculas en células y organismos vivos, pero se minimiza su uso debido a la naturaleza tóxica del cobre usado para catalizar la reacción.

Las solicitudes de patente de EE.UU. 20070020620, 20050032081 y 20050222427 se refieren al uso de una

reacción similar para unir biomoléculas a otras varias moléculas.

La patente internacional WO 2007/003054 (Shoichet) describe la inmovilización de biomoléculas sobre polímeros. Específicamente, se mencionaron polímeros biodegradables (página 1, línea 13). Se ilustra la reacción de un alquino con una azida para formar un triazol. Sin embargo, no se prevé la aplicación para la preparación de composiciones con función anticoagulante. Por otra parte, no se prevé tampoco el uso de un triazol para conseguir unión de una biomolécula a la superficie de cualquier producto sanitario.

La patente europea EP1806373 (Cordis) describe un polímero tri-ramificado neutro para recubrir productos sanitarios. El polímero típicamente es recubierto por inmersión o por pulverización sobre el dispositivo que no es tratado previamente de ninguna manera. La heparina preferida que se tiene que emplear es heparina de bajo peso molecular (es decir, degradada). La descripción parece especulativa y aunque se muestra un procedimiento para unión de heparina al andamiaje polimérico en el Esquema 1, el producto sugerido (mostrado como estructura III) parece improbable que se produzca puesto que el resto NHS de la molécula que se hacer reaccionar con heparina debería ser desplazada por un grupo amino primario no un grupo hidroxilo. La heparina contiene muy pocos grupos amino primarios, a menos que se generen por tratamiento químico, y ninguno se sitúa en el punto del extremo de la molécula.

La patente de EE.UU. 2009/0018646 (Zhao), publicada después de la fecha de prioridad reivindicada de esta solicitud, describe un polímero neutro biodegradable o bioabsorbible que tiene restos heparina ligados al mismo por un 1,2,3-triazol. El polímero es típicamente recubierto por inmersión o por pulverización sobre el dispositivo que puede soportar una primera capa polimérica que soporta fármaco pero no es tratada previamente de otro modo de ninguna manera. La heparina empleada es típicamente heparina de bajo peso molecular (véase la reivindicación 3) o heparina desulfatada (véase la reivindicación 4) para poner de manifiesto grupos amino (que no están en el punto del extremo de la molécula) que se usan como el punto de unión al polímero. Esta reacción no es adecuada prácticamente para uso con heparina natural que apenas contiene ningún grupo amino primario.

La patente de EE.UU. 2008/0089919 (Gore Enterprise Holdings, Inc.) describe entidades biológicamente activas inmovilizadas con actividad de unión de cofactor II de heparina. La patente de EE.UU. 2005/266038 (Glauser et al.) describe heparina acoplada a un polímero biocompatible mediante un espaciador que tiene un agrupamiento que hace accesible un sitio de unión de la molécula de heparina por una proteína de unión. Miura et al. (Thin Solid Films, 516 (2.008) págs. 2.443-2.449) describe la inmovilización de sacárido sobre un sustrato mediante química clic. La patente de EE.UU. 2005/0032081 (Ju et al.) describe métodos para fijar mediante enlaces covalentes una biomolécula a una segunda molécula o una superficie sólida usando química de cicloadición 1,3-dipolar. La patente internacional WO 2008/019450 (Organización para la Investigación Científica e Industrial de la Commonwealth) describe un recubrimiento de la superficie polimérica controlable que incluye una macromolécula, que se liga mediante enlaces covalentes a la superficie de un sustrato, incluyendo la macromolécula una pluralidad de iniciadores de la polimerización y una pluralidad de grupos de unión a la superficie y polímeros colgantes injertados a partir de al menos algunos de los iniciadores de la polimerización. La patente de EE.UU. 2004/0170752 (Luthra et al.) describe un método de asociación de una composición con al menos una porción de un producto sanitario para formar una capa, en la que la composición puede incluir un copolímero preparado a partir de una fusión a temperatura ambiente de una pluralidad de unidades monoméricas que comprende una primera unidad de monómero y una segunda unidad de monómero, en la que la segunda unidad de monómero presenta una temperatura de transición vítrea que es al menos aproximadamente 30 °C mayor que la temperatura de transición vítrea de la primera unidad de monómero, definiéndose una temperatura de transición vítrea de una unidad de monómero como una temperatura de transición vítrea de un homopolímero de esa unidad de monómero. La patente europea EP2014308 (Zhao), publicada después de la fecha de prioridad reivindicada de esta solicitud, describe un polímero bioabsorbible que tiene una composición antitrombótica conjugada con el mismo en la que puede estar contenido un agente antireestenótico dentro de la matriz polimérica del polímero bioabsorbible. Liu et al. (Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 83, N° 7, Julio 1.994) describe propuestas para preparar derivados de heparina con hidrofobicidad mejorada por unión de sustituyentes lipófilos a los términos reductores de las cadenas de heparina. Poulin-Kerstien et al. (Journal of the American Chemistry Society, 125, 2.003, págs. 15.811-15.821) describe la ligadura de las horquillas de unión de ADN mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar de un acetileno y azida. La patente europea EP1152013 (Netech Inc.) describe derivados de quitosán funcionalizados con un carbohidrato y/o un grupo funcional fotorreactivo.

Ahora se ha encontrado un método simple de unión mediante enlaces covalentes de entidades capaces de interaccionar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o formación de trombo, por ejemplo, heparina, y especialmente heparina de longitud completa en vez de la heparina degradada de la técnica anterior, a una superficie.

### Sumario de la invención

Según la invención se proporciona, entre otros, un producto sanitario no trombogénico con una superficie que comprende una capa de recubrimiento, siendo dicha capa de recubrimiento una composición biocompatible que comprende una capa externa de polímero catiónico funcionalizado según lo cual un resto heparina se une mediante enlaces covalentes de un punto del extremo a través de su extremo reductor a la capa externa de polímero catiónico

mediante un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.

### Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 muestra fotografías de ejemplos de tubos de PVC donde los lados lumbales se recubren con heparina degradada con ácido nítrico o heparina natural en diversas condiciones según la invención como se describe en el Ejemplo 1.5a.

La Figura 2 muestra fotografías de ejemplos de tubos de PVC donde se trata el lado luminal como se describe en el Ejemplo 1.5b y que ilustra que estos tubos no están recubiertos apropiadamente con heparina degradada con ácido nítrico.

10 La Figura 3 muestra fotografías de ejemplos de diversos sustratos diferentes recubiertos con heparina degradada con ácido nítrico según la invención como se describe en el Ejemplo 1.6.

### Descripción detallada de la invención

15 Tales entidades son conocidas para los expertos en la materia y muchos de ellos son oligosacáridos o polisacáridos. Algunas de las entidades son glucosaminoglucanos incluyendo compuestos que contienen glucosamina, galactosamina y/o ácido urónico. Los glucosaminoglucanos preferidos son "restos heparina" y especialmente heparina de longitud completa (es decir, heparina natural).

20 El término "resto heparina" se refiere a una molécula de heparina, un fragmento de la molécula de heparina o un derivado o análogo de heparina. Los derivados de heparina pueden ser cualquier variación funcional o estructural de heparina. Las variaciones representativas incluyen sales de metal alcalino o de metal alcalino-térreo de heparina, tales como heparina sódica (por ejemplo, Hepsal o Pularin), heparina de potasio (por ejemplo, Clarin), heparina de litio, heparina de calcio (por ejemplo, Calciparina), heparina de magnesio (por ejemplo, Cutheparina) y heparina de bajo peso molecular (preparada por, por ejemplo, despolimerización oxidativa o escisión desaminativa, por ejemplo, Ardeparina sódica o Dalteparina). Otros ejemplos incluyen heparán sulfato, heparinoides, compuestos basados en heparina y heparina con un contra-ión hidrófobo. Otras entidades deseables incluyen composiciones de heparina sintética referidas como composiciones "fondaparinux" que implican inhibición mediada por antitrombina III de factor Xa. Los derivados adicionales de heparina incluyen heparinas y restos heparina modificados mediante, por ejemplo, oxidación de peryodato (patente de EE.UU. 6.653.457) y otras reacciones de modificación conocidas en la técnica. Los restos heparina también incluyen tales restos ligados a un ligador o espaciador como se describe a continuación. La heparina desulfatada es menos preferida debido a su bioactividad reducida en relación con otras formas de heparina.

30 El resto heparina es unido a un solo punto, en el que el único punto es heparina unida a punto de extremo, que está conectado por su extremo reductor (a veces referido en la presente memoria como posición C1 del terminal reductor). La ventaja de la unión del punto de extremo, especialmente unión del punto de extremo reductor, es que se espera que la actividad biológica del resto heparina se maximice debido a la disponibilidad mejorada de los sitios de interacción de la trombina cuando se compara con la unión en otra parte en el resto heparina.

35 En el caso de que haya una multiplicidad de restos heparina es posible que algunos o todos ellos sean de un tipo diferente; sin embargo, se prefiere que todos ellos sean del mismo tipo.

40 En su forma más simple, el enlace consiste en el anillo de triazol solamente. Sin embargo, más normalmente, el anillo de triazol se separará por un espaciador de la superficie o del resto heparina o de ambos. El Mw (peso molecular) del enlace es convenientemente de  $10^2$  a  $10^6$  Da. La longitud del enlace es convenientemente de 10 a  $10^3$  Å. Se prefiere que los enlaces y/o espaciadores sean cadena o cadenas lineales. También es posible (aunque menos preferido) que se unan varias, es decir más de una, por ejemplo, de 2 a 100, preferiblemente 30 a 100 entidades (por ejemplo, restos heparina) a un único enlace produciendo así un enlace ramificado en el que hay varias cadenas laterales de restos heparina. En algunas realizaciones, el ligador incluye uno o más anillos aromáticos. En otras realizaciones, el ligador no incluye ningún anillo aromático excepto el anillo de triazol. En algunas realizaciones, el ligador es hidrófilo, por ejemplo, puede comprender una cadena de PEG. En un aspecto, el enlace se puede visualizar como que tiene tres porciones - "enlace A" entre la superficie y el resto triazol, el resto triazol y "enlace B" entre el resto triazol y el resto heparina. En una realización, el peso molecular del enlace A está entre  $10^1$  y  $10^3$  Da. En otra realización, el peso molecular del enlace B está entre  $10^1$  y  $10^3$  Da. En una realización, el enlace A comprende uno o más anillos aromáticos. En otra realización, el enlace A no comprende ningún anillo aromático. En una realización, el enlace B comprende uno o más anillos aromáticos. En otra realización, el enlace B no comprende ningún anillo aromático. En una realización, el enlace A es hidrófilo. En otra realización, el enlace B es hidrófilo. En una realización, el enlace A comprende una cadena de PEG. En otra realización, el enlace B comprende una cadena de PEG. En una realización, las uniones A y B son ambas hidrófilas, por ejemplo cada una comprende una cadena de PEG. Como se usa en la presente memoria, una cadena de PEG se refiere a una cadena polimérica que se puede obtener por polimerización de óxido de etileno, típicamente de peso entre  $10^2$  y  $10^6$  Da. En otro aspecto, el enlace puede comprender dos o más anillos de triazol. Por ejemplo, como se describe en los Ejemplos, el uso de un resto ligador bifuncional (tal como una bis-azida) se puede conectar en cada extremo,

respectivamente, a un resto heparina funcionalizada de alquino y una superficie funcionalizada de alquino dando como resultado el enlace que contiene dos anillos de triazol. Alternativamente, el uso de un ligador de bis-alquino se puede conectar en cada uno de los extremos, respectivamente, a un resto heparina funcionalizado de azida y una superficie funcionalizada de azida dando como resultado también el enlace que contiene dos anillos de triazol. Así, en otra realización, el enlace se puede visualizar como con cinco porciones – “enlace A” entre la superficie y un primer resto triazol, el primer resto triazol, “enlace B” entre el primer resto triazol y un segundo resto triazol, el segundo resto triazol, y “enlace C” entre el resto triazol y el resto heparina. En una realización, el peso molecular de enlace A está entre  $10^1$  y  $10^3$  Da. En una realización, el peso molecular del enlace B está entre  $10^2$  y  $10^6$  Da. En una realización, el peso molecular del enlace C está entre  $10^1$  y  $10^3$  Da. En una realización, el enlace A y/o enlace B y/o enlace C es hidrófilo, por ejemplo, comprendiendo una cadena de PEG. Por ejemplo, el enlace B (al menos) puede comprender una cadena de PEG.

Así convenientemente el enlace entre el resto heparina y la superficie es un enlace no ramificado y específicamente no incluye una ramificación de un resto polimérico hidrófobo o hidrófilo. Si se tiene que incluir convenientemente una ramificación es sólo una ramificación que contiene otro resto heparina. El enlace puede ser biodegradable o no biodegradable. Se prefiere que el enlace sea no biodegradable para que un producto sanitario recubierto sea no trombogénico durante un periodo prolongado de tiempo.

En el caso de que haya una multiplicidad de enlaces es posible que algunos o todos ellos sean de un tipo diferente; sin embargo, se prefiere que todos los enlaces sean del mismo tipo.

La superficie puede comprender una capa de recubrimiento sobre un objeto sólido, por ejemplo, un objeto conformado tal como un dispositivo y más en particular un producto sanitario. El objeto sólido puede presentar una o más porciones que contengan espacios vacíos o poros. Los poros pueden estar dentro del objeto y/o comprender al menos una superficie del objeto. Un ejemplo de un objeto sólido poroso es politetrafluoroetileno expandido (ePTFE).

El objeto sólido puede soportar una o más, por ejemplo 2 o más, o 3 ó 4 ó 5, por ejemplo, hasta 20 capas de recubrimiento de manera que deseablemente una porción de la superficie (deseado que sea no trombogénica) o el total de la superficie del objeto esté cubierta (Multilayer Thin Films ISBN: 978-3-527-30440-0). El número óptimo de capas dependerá del tipo de material del que se fabrica el objeto sólido y el uso considerado de la superficie. La superficie se puede formar, si se desea, capa a capa. El número y la naturaleza de las capas necesarias para proporcionar un recubrimiento total de la superficie se puede determinar fácilmente por los expertos en la materia. La capa o las capas de recubrimiento se pueden formar por adsorción sobre la superficie del objeto sólido de un polímero catiónico de peso molecular promedio alto, por ejemplo, una poliamina (por ejemplo, la conocida como Polymín disponible en BASF, véase también la patente europea EP 0086187 Larsson y Gölander) y si es necesario reticulación de la poliamina con, por ejemplo, un reticulador de aldehído tal como crotonaldehído y/o glutaraldehído, seguido por la aplicación de una disolución de un polímero aniónico, por ejemplo, un polisacárido aniónico, por ejemplo, sulfato de dextrano, para obtener al menos una capa adsorbida del polisacárido. Por lo tanto, la superficie puede comprender una capa de poliamina de peso molecular promedio alto y una capa de polisacárido aniónico. Más en general, la superficie puede comprender una o más bicapas de recubrimiento de polímero catiónico (por ejemplo, poliamina) y polímero aniónico (por ejemplo, polisacárido aniónico), siendo la capa más interna una capa de polímero catiónico y siendo la capa más externa una capa de polímero catiónico unida mediante enlaces covalentes al resto heparina. Este procedimiento de recubrimiento se realiza esencialmente como se describe en la patente europea EP-B-0495820. Así, es sólo la capa de recubrimiento externa la que se une al resto heparina. Típicamente, la capa de recubrimiento externa que está unida al resto heparina no está reticulada. El procedimiento de la patente europea EP-B-0495820 se puede modificar sin embargo a fin de que la capa externa sea el polisacárido aniónico que se hace reaccionar después, como se describe a continuación, con una poliamina a la que se une el resto heparina o una azida o alquino.

Previamente a aplicar la primera capa de recubrimiento la superficie del objeto sólido, por ejemplo el producto sanitario, se puede limpiar para mejorar la adhesión y el recubrimiento de la superficie. Los agentes de limpieza adecuados incluyen disolventes como etanol o isopropanol (IPA), disoluciones con alto pH como disoluciones que comprenden una mezcla de un alcohol y una disolución acuosa de un compuesto de hidróxido (por ejemplo, hidróxido de sodio), disolución de hidróxido de sodio como tal, disoluciones que contienen hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), disoluciones ácidas como Piranha (una mezcla de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno) y otros agentes oxidantes incluyendo combinaciones de ácido sulfúrico y permanganato de potasio o diferentes tipos de ácido peroxisulfúrico o disoluciones de ácido peroxisulfúrico (también como sales de amonio, de sodio y de potasio).

Así, un aspecto de la invención es un producto sanitario con una superficie en la que la superficie comprende una o más bicapas de recubrimiento de polímero catiónico y polímero aniónico, siendo la capa más interna una capa de polímero catiónico y siendo la capa más externa una capa de polímero catiónico unida mediante enlaces covalentes al resto de heparina.

La invención proporciona un producto sanitario no trombogénico con una superficie que comprende una capa externa de polímero catiónico funcionalizado según lo cual se une un resto heparina a la capa externa de polímero catiónico mediante un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.

Otro aspecto de la invención es un producto sanitario no trombogénico que se puede obtener por un procedimiento que comprende:

- (a) tratar un producto sanitario para que presente una capa superficial de polímero catiónico que ha sido funcionalizado para soportar grupos azido;
- 5 (b) hacer reaccionar dicha capa superficial de polímero catiónico que ha sido funcionalizado para soportar grupos azido con un resto heparina que es funcionalizado en su extremo reductor para soportar un grupo alquino;

para unir de ese modo el resto heparina al dispositivo a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.

10 Otro aspecto de la invención es un producto sanitario no trombogénico que se puede obtener por un procedimiento que comprende:

(a) tratar un producto sanitario para que presente una capa superficial de polímero catiónico que ha sido funcionalizado para soportar grupos alquino;

(b) hacer reaccionar dicha capa superficial de polímero catiónico que ha sido funcionalizado para soportar grupos alquino con un resto heparina que se funcionaliza en su extremo reductor para soportar un grupo azido;

15 para unir de ese modo el resto heparina al dispositivo a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.

Otro aspecto de la invención es un producto sanitario no trombogénico que se puede obtener por un procedimiento que comprende:

(a) tratar un producto sanitario para que presente una capa superficial de polímero catiónico;

20 (b) asociar a dicha capa superficial de polímero catiónico un polímero catiónico funcionalizado que soporta una pluralidad de restos heparina cargados de manera negativa que se unen a la misma en sus extremos reductores vía un enlace que comprende un 1,2,3-triazol, soportando dicho polímero catiónico una pluralidad de restos heparina cargados de manera negativa con una carga negativa neta.

25 Como se describió anteriormente, la superficie polimérica catiónica se puede preparar tratando el dispositivo con un polímero catiónico de peso molecular promedio alto tal como una poliamina y si es necesario reticularlo con, por ejemplo, un reticulador de aldehído. Las capas adicionales se pueden reforzar opcionalmente por sucesivas etapas de: (i) aplicación de una disolución de polímero aniónico (por ejemplo, polisacárido aniónico) para obtener una capa absorbida del polímero aniónico y (ii) tratar después además eso con polímero catiónico funcionalizado, tal como una poliamina, para proporcionar una capa externa absorbida de polímero catiónico funcionalizado, siendo funcionalizada la capa más externa para soportar grupos azido o grupos alquino.

30 Típicamente, la primera etapa del tratamiento del dispositivo con un polímero catiónico de peso molecular promedio alto es precedido por la etapa de limpiar la superficie del dispositivo con agentes de limpieza adecuados (por ejemplo, los mencionados anteriormente) u otros métodos de pretratamiento de la superficie conocidos en la técnica para mejorar la adherencia y el recubrimiento de la primera capa, por ejemplo, capa de poliamina.

35 Otro aspecto de la invención es un producto sanitario no trombogénico que se puede obtener por un procedimiento que comprende:

(a) tratar un producto sanitario para que presente una capa superficial de polímero aniónico;

40 (b) asociar a dicha capa superficial de polímero aniónico un polímero catiónico funcionalizado que soporta una pluralidad de restos heparina cargados de manera negativa que se unen a la misma en sus extremos reductores vía un enlace que comprende un 1,2,3-triazol, soportando dicho polímero catiónico funcionalizado una pluralidad de restos heparina cargados de manera negativa con una carga positiva neta.

45 Como se describió anteriormente, el dispositivo que presenta una capa superficial polimérica aniónica se prepara típicamente por tratamiento del dispositivo con un polímero catiónico de peso molecular promedio alto, tal como una poliamina, opcionalmente con reticulación, seguido por tratamiento de la superficie de poliamina con una disolución de polímero aniónico (por ej., polisacárido aniónico) para obtener una capa externa absorbida del polímero aniónico. Las capas adicionales se pueden reforzar por etapas sucesivas de: (i) aplicación de un polímero catiónico (opcionalmente con reticulación) para proporcionar una capa absorbida de polímero catiónico y (ii) tratando después eso con una disolución de polímero aniónico (por ejemplo, polisacárido aniónico) para obtener una capa externa absorbida del polímero aniónico.

Convenientemente, el polímero aniónico es un polisacárido tal como sulfato de dextrano o un derivado del mismo.

50 Como se usa en la presente memoria una "poliamina" es una molécula que tiene grupos amino colgantes libres múltiples (por ejemplo, 10, 100, 1.000 o más) que contiene preferiblemente al menos algunos grupos amino

primarios. Las poliaminas son típicamente moléculas poliméricas con grupos amino múltiples de alto peso molecular promedio, por ejemplo teniendo un peso molecular promedio de  $10^3$  -  $10^6$  Da. Una poliamina ejemplar es una polietilenimina tal como la conocida como Polymin disponible en BASF.

5 El polímero catiónico puede ser funcionalizado usando técnicas conocidas en la técnica. Como se ilustra en los Ejemplos a continuación, los grupos amino primarios sobre la poliamina se pueden usar como puntos de unión para el grupo alquino o azido. Sin embargo, un experto conocería cómo adaptar la química para usar grupos amino secundarios sobre la poliamina como puntos de unión para el grupo alquino o azido. Por lo tanto, las poliaminas pueden ser funcionalizadas para soportar grupos alquino o azido por medios convencionales, por ejemplo, haciendo reaccionar grupos amino primarios colgantes en la poliamina con un ácido carboxílico activado (por ejemplo, un derivado de N-hidroxisuccinimida de un ácido carboxílico) cuyo ácido soporta un grupo alquino o azido. Otra manera es hacer reaccionar aminas secundarias con ácidos carboxílicos con química de carbodiimida o hacer reaccionar con cloruros de ácido carboxílico en el caso de que la porción de ácido carboxílico soporte un grupo alquino o azido.

15 El resto heparina que soporta un grupo alquino o azido se puede preparar por métodos convencionales conocidos de por sí. Por ejemplo, la heparina que soporta un grupo alquino se puede preparar por la reacción de una alcoxiamina (es decir, molécula de fórmula R-O-NH<sub>2</sub>) que soporta un grupo alquino o azido con un grupo aldehído o hemi-acetal en el resto heparina usando técnicas convencionales conocidas de por sí o por métodos análogos a aquéllos proporcionados en los Ejemplos. La conexión se forma por una función oxí-imina (R-O-N=R' en la que R' es heparina). La heparina degradada con ácido nitroso soporta un grupo aldehído y la heparina natural contiene una función hemi-acetal en su extremo reductor que puede unirse de esta manera. El resto heparina que soporta un grupo azido también se puede preparar haciendo reaccionar el resto heparina funcional de alquino con un exceso de una azida difuncional (por ejemplo, una diazida de PEG). Un experto en la materia podrá diseñar otras maneras de introducir una azida o un grupo funcional alquino al extremo reductor de una cadena de carbohidrato.

25 Cuando se usa una capa de recubrimiento, la superficie de todos y cualquier objeto sólido se transforma para presentar la misma superficie externa funcionalizada para la unión posterior de un resto heparina capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o formación de trombo. Por lo tanto, una ventaja específica de los procedimientos descritos en la presente memoria es que en general se crea una superficie no trombogénica muy uniforme (véanse las Figuras 1 y 3).

30 El objeto sólido puede ser, por ejemplo, un polímero o material, orgánico o inorgánico, sintético o que se encuentra en la naturaleza, tal como polietileno, polipropileno, poliacrilato, policarbonato, poliamida, poliuretano (PU), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poliéter cetona (PEEK), celulosa, silicona o caucho (poliisopreno), materiales plásticos, metales, vidrio, materiales cerámicos y otros materiales sanitarios conocidos o una combinación de dichos materiales. Otros materiales sustratos adecuados incluyen fluoropolímeros, por ej., politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), politetrafluoroetileno (PTFE), etileno-propileno fluorado (FEP), copolímeros de perfluorocarburos, por ej., copolímeros de tetrafluoroetileno perfluoroalquilvinil éter (TFE/PAVE), copolímeros de tetrafluoroetileno (TFE) y perfluorometil vinil éter (PMVE), y combinaciones de lo anterior con y sin reticulación entre las cadenas poliméricas.

35 Los metales adecuados incluyen aleación de níquel-titanio (Nitinol), acero inoxidable, titanio, cobalto cromo, oro y platino. Se prefieren nitinol y acero inoxidable. También se prefiere titanio.

40 El objeto sólido es convenientemente un producto sanitario. El producto sanitario puede ser implantable o no implantable. Los ejemplos de productos sanitarios implantables o no implantables incluyen catéteres, stents, injertos stent, vasos sanguíneos artificiales, dispositivos de control permanente sanguíneo, válvulas cardíacas artificiales, electrodos de marcapasos, alambres de guía, circuitos de derivación cardiopulmonar, cánulas, balones, dispositivos de parche de tejidos, bombas de sangre, y dispositivos extracorpóreos, por ej., dispositivos de tratamiento sanguíneo extracorpóreos y dispositivos de transfusión.

45 Se prefiere que la superficie recubierta a la que se une el resto heparina sea de manera que retenga propiedades no trombogénicas después de esterilización, por ej., esterilización con óxido de etileno (OE).

La esterilización se puede llevar a cabo por medios conocidos para los expertos en la materia. El método preferido de esterilización es usar gas óxido de etileno. Alternativamente, se pueden usar otros métodos tales como radiación, por ej., haz electrónico o radiación gamma, en el caso de que tal radiación no degrade el objeto o el recubrimiento o ambos.

50 Una realización preferida de la presente invención se refiere a un producto sanitario recubierto para implantación, por ej., implantación permanente, u otra colocación, en un sitio anatómico. Otras realizaciones preferidas incluyen dispositivos de uso temporal tales como catéteres y circuitos extracorpóreos. Son ejemplos productos sanitarios estériles (por ejemplo, esterilizados) para colocación en el interior de una estructura anatómica que delimite un espacio vacío, o lumen, para reforzar la estructura anatómica o mantener el espacio vacío. Convenientemente, el resto heparina unido, no eluye en ninguna extensión sustancial y permanece con el dispositivo. Por ejemplo, la actividad de unión de AT retenida se mantiene adecuada (por ej., mayor que 2 ó 4 ó 5 ó 10 pmol/cm<sup>2</sup>) y cuando se ensaya en el ensayo de evaluación del ciclo de Sangre (véase el Ejemplo 1.5a) con 15 horas enjuague con NaCl (0,15 M) previamente a ensayo con sangre fresca de un donador sano la reducción en el recuento de plaquetas de

la sangre después del ensayo disminuye sustancialmente para la sangre expuesta a la superficie recubierta que la de un control no recubierto (por ej., la reducción en recuento de plaquetas después del ensayo de la sangre expuesta a la superficie recubierta es menor que 20%, preferiblemente menor que 15% y más preferiblemente menor que 10%).

- 5 Convenientemente, la composición biocompatible de la invención es no biodegradable o bioabsorbible. Para composiciones biodegradables o bioabsorbibles se puede esperar en general que las propiedades no trombogénicas estén limitadas en el tiempo.

10 El carácter no trombogénico de los dispositivos según la presente invención se puede ensayar por una serie de métodos. Por ejemplo, el carácter no trombogénico puede estar asociado a tener una alta actividad de unión de antitrombina, especialmente cuando se compara con dispositivos que tienen superficies no tratadas.

15 Por ejemplo, se prefiere que la superficie, por ejemplo, del producto sanitario, tenga una actividad de unión de antitrombina (AT) de al menos 2, por ejemplo, al menos 5 picomoles de AT por centímetro cuadrado ( $\text{pmol}/\text{cm}^2$ ) de superficie. En otras realizaciones, la actividad de unión de AT es al menos 6  $\text{pmol}/\text{cm}^2$ , al menos 7  $\text{pmol}/\text{cm}^2$ , al menos 8  $\text{pmol}/\text{cm}^2$ , al menos 9  $\text{pmol}/\text{cm}^2$  o al menos 10  $\text{pmol}/\text{cm}^2$  de superficie. En algunas realizaciones, la actividad de unión de AT es al menos 100  $\text{pmol}/\text{cm}^2$  de superficie. La actividad de unión de AT se puede medir por métodos conocidos en la técnica, por ej., los descritos en Pasche., et al., en "Binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" *Artif.- Organs* 15: 481-491 (1.991) y la patente de EE.UU. 2007/0264308. Como comparación se puede concluir de Sanchez et al (1.997) *J. Biomed. Mater. Res.* 37 (1) 37-42, véase la Figura 1, que los valores de unión de AT de alrededor de 2,7-4,8  $\text{pmol}/\text{cm}^2$  (dependiendo del entorno experimental) o más no parecen dar lugar a actividad enzimática trombogénica significativa en contacto con plasma.

25 Alternativamente o adicionalmente se prefiere que la superficie sea no trombogénica debido a alta capacidad para suprimir la coagulación y otros sistemas de defensa en el ensayo de evaluación del ciclo de Sangre descrito en el Ejemplo 1.5a. De acuerdo con ese ensayo, la superficie que se tiene que investigar se aplica a un tubo de PVC que se enjuaga durante 15 horas con NaCl 0,15 M previamente a ensayo con sangre fresca. Se indica no trombogenicidad por una reducción en el recuento de plaquetas de la sangre medido después del ensayo que es sustancialmente menor para la sangre expuesta a la superficie preparada de acuerdo con el método descrito en la presente memoria que la de un control no recubierto (por ejemplo, la reducción en el recuento de plaquetas después del ensayo para la sangre expuesta a la superficie recubierta es menor que 20%, preferiblemente menor que 15% y más preferiblemente menor que 10%).

- 30 Otros métodos de evaluación de la sangre similares diferentes del modelo de ciclo de Sangre pueden ser realizados por los expertos en la materia para valorar la trombogenicidad/no trombogenicidad.

La cantidad del resto heparina ligado a una superficie particular se puede controlar y ajustar, por ej., ajustando la cantidad de los reactivos usados en la síntesis de la composición.

35 La distribución del resto heparina sobre la superficie se puede determinar por técnicas de tinción convencionales que son conocidas de por sí, por ej., la distribución de heparina se puede determinar usando azul de toluidina.

40 De acuerdo con la invención también se proporciona un procedimiento para la producción de un resto heparina capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o formación de trombo, resto heparina que está ligado mediante enlaces covalentes a una superficie a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol, procedimiento que comprende la reacción de un correspondiente resto heparina que soporta un grupo alquino en su extremo reductor con una correspondiente superficie que soporta un grupo azido o la reacción de un correspondiente resto heparina que soporta un grupo azido en su extremo reductor con una correspondiente superficie que soporta un grupo alquino.

Este procedimiento se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos de por sí.

45 La superficie que soporta un grupo azido o un grupo alquino se puede preparar por métodos convencionales conocidos de por sí, por ejemplo, haciendo reaccionar una superficie, por ejemplo una superficie como se describe en la patente europea EP-B-0086186 o la patente europea EP-B-0086187 que soporta grupos sulfato cargados negativamente con una poliamina apropiada que soporta una azida o un grupo alquino, respectivamente.

De acuerdo con la invención, también se proporciona una poliamina que soporta un resto heparina a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.

50 En una realización en que se usa la reacción la superficie soporta el grupo azido. En otra realización en que se usa la reacción el resto heparina soporta el grupo azido.

55 La reacción se puede llevar a cabo en presencia de un catalizador de metal, por ejemplo un catalizador de cobre, por ejemplo un catalizador de Cu (I) usando condiciones de reacción usadas convencionalmente en la cicloadición de Huisgen (la cicloadición 1,3-dipolar de una azida y un alquino terminal para formar un 1,2,3-triazol). El catalizador de Cu (I) se puede producir, si se desea, *in situ*, por ej., por reducción de un correspondiente compuesto de Cu (II)

usando por ejemplo ascorbato de sodio. La reacción también se puede llevar a cabo, si se desea, en condiciones de flujo.

5 Como se indicó en la sección Técnica Anterior en relación a la descripción de Baskin, otros han comentado sobre la posible naturaleza tóxica del catalizador de Cu (I) usado para catalizar esta reacción. Sin embargo, como se muestra en el Ejemplo 1.8, nuestro recubrimiento parece ser no tóxico. Sin estar limitados por la teoría, es posible que cualquier catalizador de Cu (I) residual se lave de la superficie de lo contrario la superficie de poliamina la compleja haciéndola así incapaz de ejercer ningún efecto tóxico.

10 La reacción se puede realizar, por ejemplo, a una temperatura de desde aproximadamente 5 a 80°C, preferiblemente a aproximadamente temperatura ambiente. El pH usado en la reacción puede ser de aproximadamente 2-12, preferiblemente aproximadamente 4-9 y lo más preferiblemente a aproximadamente 7. Los disolventes adecuados incluyen aquéllos en que el resto heparina unido a la azida o alquino es soluble, por ej., dimetilsulfóxido, dimetilformamida, tetrahidrofurano y preferiblemente agua o mezclas de agua con uno de lo anterior. La proporción del resto heparina a la superficie se puede ajustar para proporcionar la densidad deseada del resto heparina sobre la superficie. Se prefiere usar una proporción de los reactivos de manera que no queden grupos azida o alquino libres sobre la superficie resultante.

15 Por este nuevo método el resto heparina, se puede ligar ventajosamente a la superficie por grupos superficiales que no están implicados en el desarrollo del recubrimiento de la superficie. Por el contrario, la técnica anterior descrita en las patentes europeas EP-B-0086186, EP-B-0086187 y EP-B-0495820 usa el mismo tipo de grupos (aminas primarias) en el procedimiento de recubrimiento de superficie capa a capa que los usados para unir la heparina al recubrimiento.

20 Este nuevo procedimiento tiende a ser menos sensible al pH que los procedimientos de la técnica anterior, que es también ventajoso.

25 De acuerdo con la invención, también se proporciona un resto heparina, resto heparina que soporta un grupo alquino o uno azido. También se proporciona un resto heparina capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o formación de trombo, resto heparina que soporta un grupo alquino o uno azido, grupo alquino o azido que está unido a un ligador, en el que el ligador está unido en el punto de extremo al resto heparina a través de su extremo reductor. El resto heparina es convenientemente un resto heparina de longitud total (es decir, heparina natural).

30 También se describe una superficie de poliamina funcionalizada, por ejemplo, una superficie preparada esencialmente como se describe en las patentes europeas EP-B-0086186, EP-B-0086187 y EP-B-0495820, pero que soporta adicionalmente uno o más grupos alquino en la capa más externa de poliamina.

También se describe un producto sanitario que tiene una superficie de poliamina que soporta un grupo alquino, por ejemplo, un grupo alquino que está conectado a un grupo amino de la superficie de poliamina vía un enlace.

35 Según una característica adicional de la invención, también se proporciona un procedimiento para la producción de un resto heparina capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o formación de trombo, resto heparina que se liga mediante enlaces covalentes a una superficie a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol, en el que la superficie comprende una o más capas de polisacárido (es decir, polisacárido aniónico) y poliamina, procedimiento que comprende la reacción de una correspondiente superficie que tiene una capa externa de polisacárido (es decir, polisacárido aniónico, por ejemplo, soportando grupos sulfato cargados negativamente) con una poliamina que soporta un correspondiente resto heparina a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol o la reacción de una correspondiente superficie con una capa externa de polisacárido (es decir, polisacárido aniónico, por ejemplo, soportando grupos sulfato cargados negativamente) con una poliamina que soporta una azida o grupo alquino y haciendo reaccionar el producto resultante con un resto heparina que soporta un grupo alquino o azido, respectivamente.

45 Este procedimiento para atribuir las capas de polisacárido y poliamina se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos de por sí, por ejemplo procedimientos análogos a los descritos en la patente europea EP-B-0495820.

También se describe una poliamina funcionalizada, por ejemplo Polymin que soporta uno o más grupos alquino, por ejemplo, vía un ligador.

50 De acuerdo con la invención, también se proporciona una poliamina funcionalizada que soporta un resto heparina unido a la misma a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol. Está poliamina se puede preparar por procedimientos conocidos de por sí, por ejemplo, análogos a los descritos en otra parte en esta memoria descriptiva.

Los productos de la invención pueden presentar una o más de las siguientes propiedades ventajosas:

El grado de sustitución del resto heparina sobre la superficie puede ser controlado;

Tanto la unión en el punto de extremo (un punto) como la unión en puntos múltiples del resto heparina, por ejemplo heparina, se pueden conseguir, aunque se prefiere la unión del punto de extremo (especialmente punto de extremo reductor);

La longitud de ligador entre el resto heparina y la superficie puede ser controlada;

- 5 Se puede usar la heparina de longitud completa evitándose así la escisión de heparina y el desecho de partes del producto escindido implicado en la degradación de ácido nitroso de la técnica anterior de heparina;

Cuando se escinde heparina, se puede destruir la secuencia de unión de antitrombina en algunos de los fragmentos, usando por lo tanto heparina de longitud completa o la heparina ligada vía un espaciador también puede mejorar la biodisponibilidad de la heparina ligada;

- 10 Se puede obtener una distribución uniforme del resto heparina sobre la superficie;

La biodisponibilidad del resto heparina se puede controlar, por ejemplo, por el uso de diferentes enlaces (longitud, tipo);

Se puede obtener una superficie no trombogénica que no lixivie heparina y por lo tanto presente una vida prolongada.

- 15 Se describe en la presente memoria una composición biocompatible que comprende una entidad capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o formación de trombo, entidad que está unida mediante enlaces covalentes a una superficie a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.

- 20 El experto apreciará que la composición biocompatible se puede aplicar a cualquier objeto sólido, de la cual es un ejemplo un producto sanitario. Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un objeto sólido que tiene una superficie que comprende (por ejemplo, recubierto con) dicha composición biocompatible. La invención se ilustra por los siguientes Ejemplos:

Ejemplo 1.1: Preparación de una superficie no trombogénica sobre oro.

- 25 Una superficie que comprende capas de polímero aminado y polisacárido sulfatado con una capa externa de polímero aminado funcionalizado está conectada a heparina funcionalizada formando de ese modo un anillo de triazol.

- 30 Se trató previamente una superficie de oro (sobre un cristal de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés)) usando el método descrito por Larm et al en las patentes europeas EP-B-0086186 y EP-495820 (capa a capa; interacciones de carga de polielectrólito) terminando con una capa de polisacárido sulfatado. Las superficies de oro se limpiaron primero con etanol. La imprimación se acumuló por adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Polymín) y polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano). La poliamina se reticula con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada par de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de oro se imprimó con 3 bicapas terminando con el polisacárido sulfatado. Se diluyó Polymín SN (Lupasol SN; Lupasol es un nombre comercial alternativo para Polymín) con agua para preparar una disolución madre (se añadieron 5 g de Polymín SN a 20 ml de agua purificada). (Polymín es un agente tensioactivo catiónico de polietilenimina disponible en BASF).

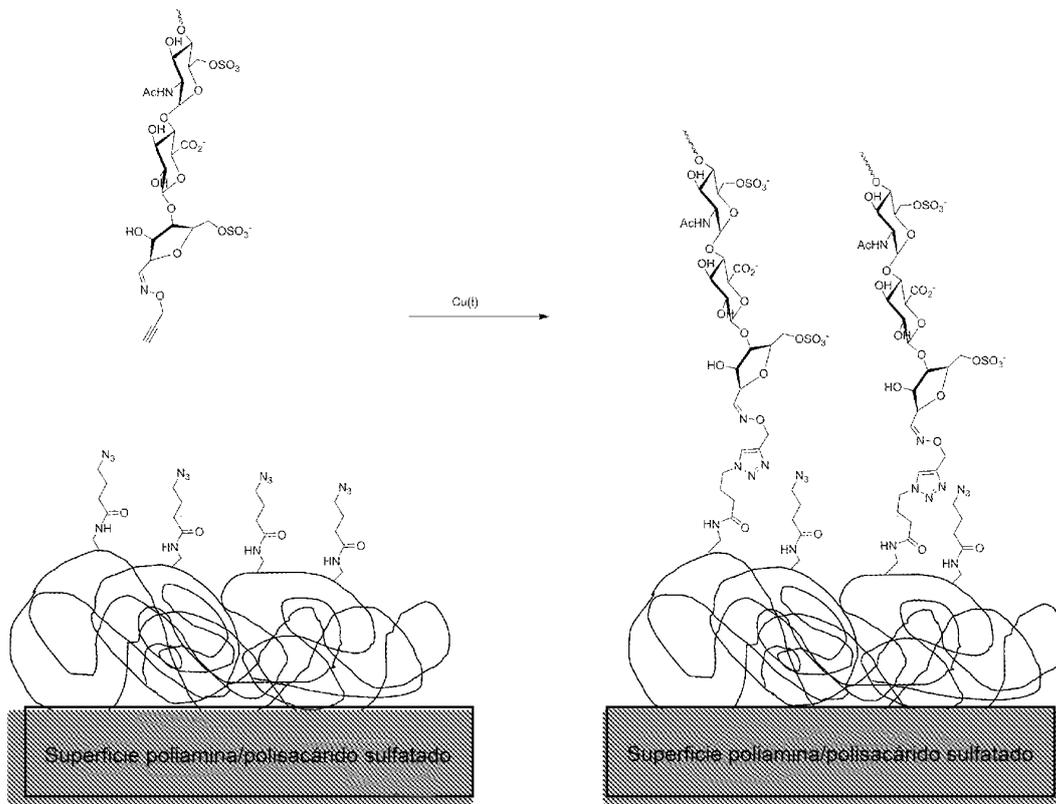
- 35 El procedimiento completo se llevó a cabo a un caudal de 500 µl/min. en un sistema Q-Sense E4 (<http://www.q-sense.se/>) con una bomba peristáltica (Ismatec IPC-N 4).

- 40 Se añadieron 100 µl de una disolución al 5% de poliamina funcionalizada de azida (preparación véase el Ejemplo 2a) a 100 ml de un tampón borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. La adsorción de la poliamina funcional de azida a la superficie de sulfato se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un enjuague con agua de dos minutos después de adsorción para enjuagar el exceso de polímero.

Se disolvieron 50 mg de heparina degradada con nitrito, con funcionalización de alquino en C1 del terminal reductor (preparado como en el Ejemplo 3a), en 200 ml de agua desionizada y 25 mg de CuSO<sub>4</sub>x 5H<sub>2</sub>O, 50 mg de ascorbato de sodio y se añadieron 2,9 g de NaCl. El pH se midió que era 4,4.

- 45 La reacción entre la disolución de la heparina funcionalizada de alquino y la superficie funcionalizada de azida se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 h. Se realizó purificación por enjuague de heparina ligada mediante enlaces no covalentes durante 10 minutos usando un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. Se realizó un enjuague final con agua desionizada durante dos minutos para lavar los restos de sal de tampón.

50



Resultados analíticos:

Actividad de unión de antitrombina de heparina ligada: 21 pmol/cm<sup>2</sup>

5 La actividad de unión de antitrombina de heparina ligada se midió esencialmente como se describe en Pasche., et al., en "Binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" Artif.-Organs 15: 481-491 (1.991).

Ejemplo 1.2: Preparación de una superficie no trombogénica sobre oro.

10 Una superficie que comprende capas de polímero aminado y polisacárido sulfatado con una capa externa de polímero aminado funcionalizado está conectada a heparina funcionalizada formando de ese modo un anillo de triazol.

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1.1 con ligera variación de los parámetros como sigue:

Se emplearon 200 µl (2 ml/l) de una disolución al 5% de poliamina funcionalizada de azida (preparada como en el Ejemplo 2a);

15 La adsorción de la poliamina con funciones azida a la superficie de sulfato se llevó a cabo durante 20 minutos a temperatura ambiente;

Se emplearon 50 mg (250 mg/l) de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y 100 mg (500 mg/l) de ascorbato de sodio;

El pH se midió que era 4,8.

Finalmente, se midió la actividad de unión de antitrombina de heparina ligada de la superficie de oro recubierta como 30 pmol/cm<sup>2</sup>.

20 Ejemplo 1.3 (comparación)

Se recubrió otra superficie de oro idéntica de la exacta misma manera que se describió en el Ejemplo 1.2 anteriormente excepto que no se añadió CuSO<sub>4</sub> como catalizador en la etapa de acoplamiento de heparina. La actividad de unión de antitrombina de heparina ligada fue insignificante mostrando que si no tenía lugar acoplamiento covalente la heparina se elimina por enjuague en la última etapa de enjuague de tampón.

25

Ejemplo 1.4: Preparación de una superficie no trombogénica sobre oro.

Se recubrió una superficie de oro como en el Ejemplo 1.2 usando heparina natural, con funcionalización de alquino en C1 del terminal reductor (preparado como en el Ejemplo 3b) a pH 4,8 y también a pH 7 (pH ajustado con HCl 1 M y NaOH 1 M, respectivamente).

- 5 La actividad de unión de antitrombina de heparina ligada de la superficie de oro recubierta se midió como 25 pmol/cm<sup>2</sup> para la superficie preparada a pH 4,8 y 44 pmol/cm<sup>2</sup> cuando la preparación se realizó a pH 7.

Ejemplo 1.5a: Preparación de una superficie no trombogénica sobre PVC.

10 La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un agente oxidante. Después se imprimó como en el Ejemplo 1.1 con 3 bicapas terminando con polisacárido sulfatado. La imprimación se hizo reaccionar después como en el Ejemplo 1.2 primero con una poliamina funcionalizada de azida (preparada como en el Ejemplo 2a) seguido por reacción con heparina degradada con ácido nitroso, con funcionalización de alquino en C1 del terminal reductor (preparado como en el Ejemplo 3a) a pH 4,8 y, por separado, con heparina natural, con funcionalización de alquino en C1 del terminal reductor (preparado como en el Ejemplo 3b) a pH 4,8 y, por separado, a pH 7. La purificación se realizó usando el mismo tampón y un enjuague de agua como en el Ejemplo 1.1. En  
15 ambos experimentos, el flujo usado durante el procedimiento completo se fijó a 100 ml/min. La actividad de unión de antitrombina de heparina ligada para las muestras se ensayó y se encontró que era aceptable (es decir, por encima de 2 pmol/cm<sup>2</sup>).

20 Se tiñeron las muestras con azul de toluidina ("AT") (200 mg/l en agua) por inmersión en la disolución durante 2 minutos seguido por enjuague con agua extenso. El AT se une a la heparina vía interacción iónica. Como se muestra en la Figura 1, la coloración es uniforme mostrando que la heparina se distribuye uniformemente sobre la superficie.

25 Se analizaron las muestras recubiertas de nuevo después de almacenamiento a temperatura ambiente (más de 8 meses) en una bolsa de hoja de aluminio con un desecador en el interior para mostrar estabilidad del recubrimiento. Se ensayó la actividad de unión de antitrombina de heparina ligada para las muestras después de envejecimiento y se encontró que era aceptable (es decir, por encima de 2 pmol/cm<sup>2</sup>).

Ensayo de evaluación de ciclo de sangre.

30 Se realizó la evaluación del ciclo de sangre en estas muestras almacenadas para mostrar la bioactividad de la heparina preservada de la superficie no trombogénica. Primero se lavó el lado luminal de los tubos recubiertos con NaCl 0,15 M durante 15 horas a un caudal de 1 ml/min., para asegurar que toda la heparina ligada ligeramente se eliminara por aclarado y quedara una superficie estable. Después se incubaron los tubos lavados en un modelo de ciclo de Chandler realizado esencialmente de acuerdo con Anderson *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) a 2,1 rad/s (20 rpm). Las plaquetas, de sangre fresca y de sangre recogida de los ciclos, se contaron en un contador de células para medir la pérdida de plaquetas que indica trombosis. Como referencias se incluyó un control no trombogénico (es decir, Carmeda BioActive Surface®applied a PVC, que se prepara esencialmente como se describe en la patente europea EP-B-0495820), un tubo de PVC no recubierto y un control trombogénico (es decir, un recubrimiento de tres bicapas con una capa externa de polisacárido sulfatado que no une antitrombina).

40 Como se observa en la tabla a continuación no hay virtualmente pérdida de plaquetas (la pérdida de plaquetas indica trombosis) observada para los recubrimientos preparados usando los recubrimientos de heparina degradada almacenada y natural preparados en este ejemplo (Ejemplo 1.5a). El tubo de PVC no recubierto y la superficie con una capa externa de polisacáridos sulfatados (antitrombina que no se une) muestra una trombosis significativa en este experimento.

	Superficies evaluadas	Recuento de plaquetas x 10 <sup>9</sup> /l	Pérdida en recuento de plaquetas %
Valor inicial, sangre antes de ciclo de Chandler		206	
Superficies evaluadas según la invención	Heparina degradada	203	1
	Heparina natural	190	8
Superficies de referencia	Control no trombogénico	195	5
	Tubo de PVC no recubierto	116	44
	Control trombogénico	3	99

Estos resultados demuestran las propiedades no trombogénicas de la superficie estable preparada según la invención.

Ejemplo 1.5b (comparación)

5 Se realizó una variación en el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.5a pero usando ahora una poliamina que no fue funcionalizada con azidas y una heparina degradada con ácido nitroso sin un alquino. Se tiñó la muestra con AT y también con Ponceau S (PS) usando el procedimiento descrito anteriormente. La disolución de agua de PS contenía 200 mg/l de PS y 5,75 ml/l de ácido acético. Como se muestra en la Figura 2 (panel superior) no se observó tinción con AT después de este procedimiento alternativo. Sin embargo, en la Figura 2 (panel inferior) se observa una coloración roja del PS que indica la existencia de una capa aminada externa. Esto muestra que no se unió heparina después del procedimiento alternativo y que toda la heparina no ligada mediante enlaces covalentes se eliminó por lavado durante el aclarado con tampón.

Ejemplo 1.6: Preparación de una superficie no trombogénica en diversos sustratos diferentes.

15 Se limpiaron diferentes sustratos (FEP, PTFE, polímero de silicona, poliuretano (PU), acero inoxidable y titanio) con isopropanol y un agente oxidante. Se imprimieron después como en el Ejemplo 1.1 con 4 bicapas terminando con polisacárido sulfatado. Se hizo reaccionar después la imprimación como en el Ejemplo 1.2 primero con poliamina funcionalizada de azida (preparada como en el Ejemplo 2a) seguido por reacción con heparina degradada con ácido nitroso, con funcionalización de alquino en C1 del terminal reductor (preparado como en el Ejemplo 3a) a pH 7 (ajustado con HCl 1 M y NaOH 1 M). Se realizó purificación usando el mismo tampón y aclarado con agua como en el Ejemplo 1.1. Se realizó el recubrimiento sumergiendo los materiales en las disoluciones de recubrimiento.

Como se puede observar de la Figura 3, la tinción con AT (como se describió en el Ejemplo 1.5a) muestra una distribución uniforme de heparina sobre todos los sustratos (las pequeñas pintas no teñidas son debidas al montaje de sujeción de los materiales).

25 La actividad de unión de antitrombina de heparina ligada para los diferentes sustratos recubiertos se muestra en la tabla a continuación medida después de esterilización mediante óxido de etileno (OE). La esterilización con OE se realiza usando una técnica de esterilización clásica usada para productos sanitarios.

Sustrato	Absorción de AT después de esterilización con OE (pmol/cm <sup>2</sup> )
FEP	19
PTFE	7,3
Titanio	12
Acero	13
Silicona	7,6
PU	14

Los datos muestran que a pesar de la exposición a condiciones rigurosas de esterilización la actividad retenida es aún aceptable.

30 Ejemplo 1.7a: Preparación de una superficie no trombogénica en un producto sanitario.

El lado luminal de un injerto Vascular Gore-Tex (pared delgada, diámetro de 5 mm, número de catálogo: VT05070L) se limpió con isopropanol. Después se imprimió como en el Ejemplo 1.1 con 2 bicapas terminando con polisacárido sulfatado. Después se hizo reaccionar la imprimación como en el Ejemplo 1.2 primero con una poliamina funcionalizada con azida (preparada como en el Ejemplo 2a) seguido por reacción con heparina degradada con ácido nitroso, con funcionalización de alquino en C1 del terminal reductor (preparado como en el Ejemplo 3a) a pH 7 (ajustado con HCl 1 M y NaOH 1 M). Se realizó purificación usando el mismo tampón y enjuague con agua como en el Ejemplo 1.1. El caudal usado durante el procedimiento completo se fijó a 30 ml/min. La actividad de absorción de antitrombina de heparina después de esterilización con OE (condiciones como en el ejemplo 1.6) se midió como 8,7 pmol/cm<sup>2</sup>. Los datos muestran que a pesar de la exposición a condiciones rigurosas de esterilización la actividad retenida es aún aceptable.

Ejemplo 1.7b: Preparación de una superficie no trombogénica sobre un producto sanitario.

El método del Ejemplo 1.7a se puede repetir usando heparina natural, modificada con funcionalización de alquino del terminal reductor (preparado como en el Ejemplo 3b o 3c) para proporcionar un injerto recubierto con una superficie no trombogénica que comprende heparina natural modificada.

5 Ejemplo 1.8: Preparación de una superficie biocompatible sobre un HDPE (Polietileno de Alta Densidad)

Se limpió una lámina de HDPE (30 cm<sup>2</sup>, patrón de referencia USP) por inmersión en una disolución de KMnO<sub>4</sub> concentrado (2 g/l) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado durante 2 minutos según el método de la patente europea EP 0086186 (Larm *et al*). Se imprimió después la lámina como en el Ejemplo 1.1 con 3 bicapas terminando con polisacárido sulfatado. Se hizo reaccionar después la imprimación como en el Ejemplo 1.2 primero con una poliamina funcionalizada con azida (preparada como en el Ejemplo 2a) seguido por reacción con heparina degradada con ácido nitroso, con funcionalización de alquino en C1 del terminal reductor (preparado como en el Ejemplo 3a) a pH 7 (ajustado con HCl 1 M y NaOH 1 M). Se realizó purificación usando el mismo tampón y enjuague con agua como en el Ejemplo 1.1. Se realizó el recubrimiento sumergiendo los materiales en las disoluciones de recubrimiento. Se encontró que el recubrimiento no era tóxico en un ensayo de citotoxicidad usando el ensayo de elución de Medio Mínimo Esencial (MEM) como se describe en ISO10993. Estos resultados demuestran la biocompatibilidad de la superficie evaluada.

Ejemplo 1.9: Preparación de una superficie biocompatible sobre PVC (funcionalidad inversa y espaciador de PEG)

La superficie luminal de un tubo de PVC (diámetro interno de 3 mm) se limpió con isopropanol y un agente oxidante. Después se imprimió con cuatro bicapas de una poliamina cargada de manera positiva (Polymin) y un polisacárido sulfatado cargado de manera negativa (sulfato de dextrano) terminando con el polisacárido sulfatado.

Después en la siguiente etapa de recubrimiento se usó una disolución de 2 ml de una disolución al 5% de poliamina funcionalizada de alquino (preparada como en el Ejemplo 2b) en 1.000 ml de un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. La adsorción de poliamina con funciones azida a la superficie de sulfato se realizó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un enjuague con agua de dos minutos después de la adsorción para eliminar por enjuague el polímero en exceso.

Después se usó una disolución de 250 mg de heparina, con funcionalización de azida y un espaciador de polietilenglicol (PEG) en C1 del terminal reductor, 250 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 50 mg de ascorbato de sodio y 2,9 g de NaCl en 1.000 ml de agua desionizada. Se ajustó el pH a 7 (ajustado con HCl 1 M y NaOH 1 M).

El Ejemplo 1.9a usó heparina degradada con ácido nitroso con un grupo funcional azida y un espaciador de PEG pequeño preparado según el Ejemplo 4a.

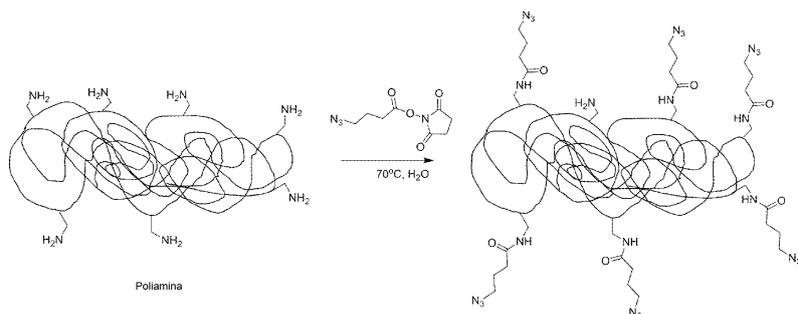
El Ejemplo 1.9b usó heparina degradada con ácido nitroso con un grupo funcional azida y un espaciador de PEG grande preparado según el Ejemplo 4b.

El Ejemplo 1.9c usó heparina natural con un grupo funcional azida y un espaciador de PEG pequeño preparado según el Ejemplo 4c.

35 El Ejemplo 1.9d usó heparina natural con un grupo funcional azida y un espaciador de PEG grande preparado según el Ejemplo 4d.

La reacción entre la disolución y la heparina funcionalizada de azida y la superficie funcionalizada de alquino se realizó a temperatura ambiente durante 1 h. Se realizó purificación eliminando por enjuague heparina no ligada mediante enlaces covalentes durante 10 minutos usando un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. Se realizó un enjuague final con agua desionizada durante dos minutos para lavar los residuos de sal de tampón.

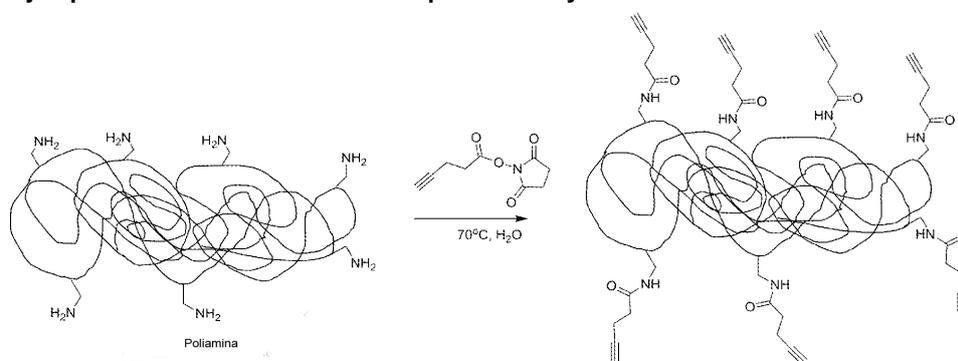
#### Ejemplo 2a: Funcionalización de azida de Polymin SN



Se diluyó Polymin SN (Lupasol SN; Lupasol es un nombre comercial alternativo para Polymin) con agua para preparar una disolución madre (se añadieron 5 g de Polymin SN a 20 ml de agua purificada). (Polymin es un tensioactivo catiónico de polietilenimina disponible en BASF).

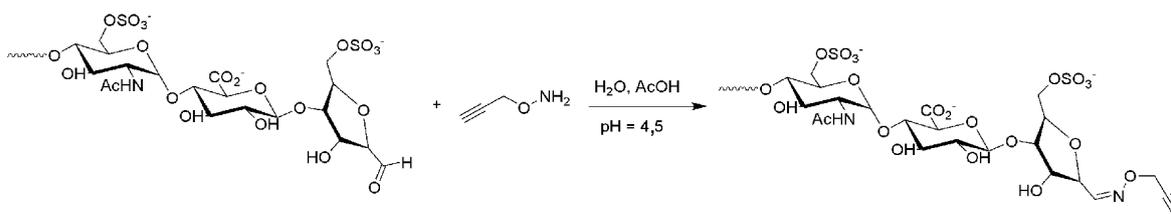
Una disolución de azidobutirato de N-hidroxisuccinimida (Ref: Khoukhi; Vaultier; Carrie, - Synthesis and reactivity of methyl [gamma]-azido butyrates and ethyl [sigma]-azido valerates and of the corresponding acid chlorides as useful reagents for the aminoalkylation. *Tetrahedron* 1.987, 43, (8), 1.811-1.822. y Malkoch, M.; Schleicher, K.; Drockenmuller, E.; Hawker, C. J.; Russell, T. P.; Wu, P.; Fokin, V. V., Structurally Diverse Dendritic Libraries: A Highly Efficient Functionalization Approach Using Click Chemistry. *Macromolecules* 2.005, 38, (9), 3.663-3.678. (véase también R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpene, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *Journal of the American Chemical Society*, 2.007, **129** (21) 6.859 – 6.864) (1,7 g, 7,5 mmol) en 10 ml de agua purificada se mezcló con 24 ml de Polymin SN (dando como resultado ~5 mmoles de aminas primarias en la disolución acuosa) y se dejó reaccionar durante la noche a 70°C. Se diluyó después la mezcla de reacción con agua e isopropanol (mín 99%, calidad PhEur, Merck) hasta que precipitó el polímero. Se separó por decantación el isopropanol y se separó por evaporación el isopropanol residual de la suspensión resultante. Se analizó el polímero funcionalizado por RMN y FTIR. FTIR mostró una señal típica de  $-N_3$  a  $2.100\text{ cm}^{-1}$ .

### Ejemplo 2b: Funcionalización de alquino de Polymin SN



Se preparó poliamina funcional de alquino esencialmente como en el Ejemplo 2a pero usando (4-pentinoato) de N-hidroxisuccinimida (Ref: Salmain, M.; Vessieres, A.; Butler, I. S.; Jaouen, G. *Bioconjugate Chemistry* 1.991, **2** (1), 13-15) en vez de azidobutirato de N-hidroxisuccinimida.

### Ejemplo 3a: Preparación de heparina degradada de ácido nitroso funcionalizada de alquino.



20

Reactivos:

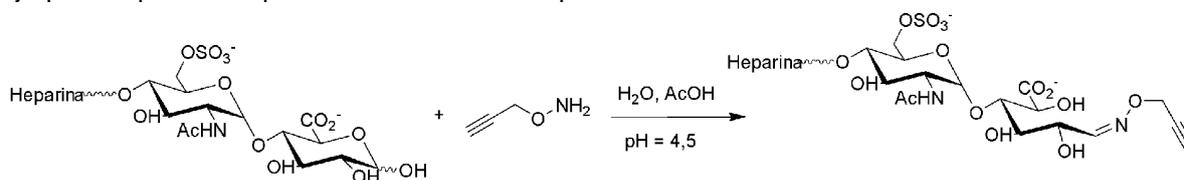
- (i) Heparina degradada con ácido nitroso con grupos aldehído (preparada esencialmente como en el Ejemplo 2 de USP 4.613.665) 3,25 g en peso seco (0,65 mmoles)
- (ii) Hidrocloruro de O-(prop-2-inil)-hidroxilamina (Ref: Xu, R.; Sim, M. K.; Go, M. L, Synthesis and pharmacological characterization of O-alkynyloximes of tropinone and N-methylpiperidinone as muscarinic agonists. *J Med Chem* 1h998, 41, (17), 3.220-3.231) 0,70 g en peso seco (6,5 mmoles)
- (iii) Ácido acético (100% Merck) 3 ml
- (iv) Agua purificada 50 ml

Se disolvieron los compuestos en los disolventes mezclados y se ajustó el pH a 4,5 con NaOH 4 M. Se continuó la reacción durante 3 días a temperatura ambiente. Se dializó el producto resultante contra agua purificada con una membrana de diálisis SpectraPor PML (límite de peso molecular) 1 kD (ancho plano 45 mm).

Se analizó el producto funcionalizado por FTIR que mostró una señal típica del alquino a  $3.100\text{ cm}^{-1}$ . La actividad de la heparina funcionalizada fue 96 UI/mg que indica que la actividad de la heparina funcionalizada no resulta afectada

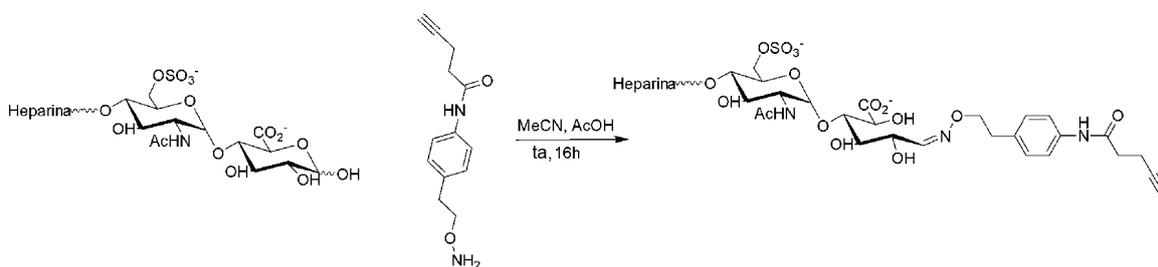
sustancialmente por funcionalización.

**Ejemplo 3b: Preparación de heparina natural funcionalizada de alquino**



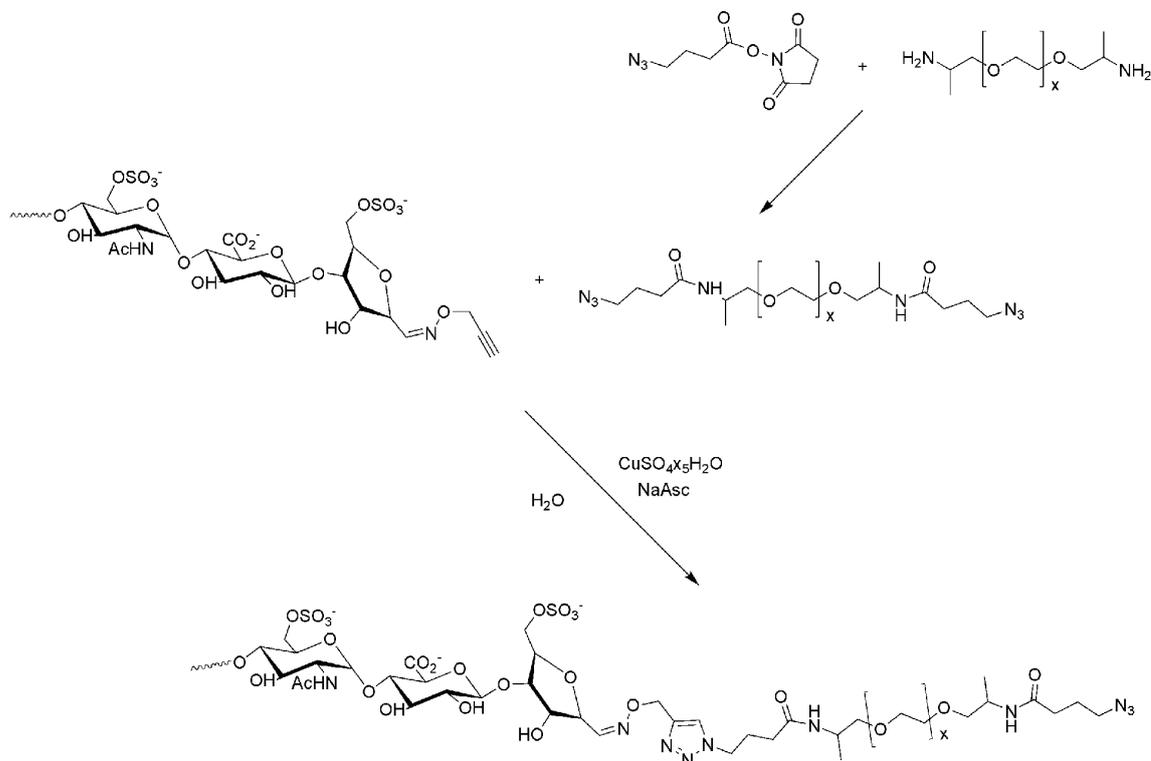
5 La heparina natural (SPL, Scientific Protein Laboratories, lote nº 1.037) se funcionalizó según los procedimientos descritos en el Ejemplo 3a. La actividad de la heparina funcionalizada fue 211 UI/mg que indica que la actividad de la heparina funcionalizada no se ve afectada sustancialmente por funcionalización.

**Ejemplo 3c: Preparación de heparina natural funcionalizada de alquino con un espaciador aromático.**



10 Se disolvió la heparina natural (SPL, Scientific Protein Laboratories, lote nº 1.037) (20 mg) en 250 µl de ácido acético (100% Merck) y se añadieron 250 µl de agua purificada y 6 µl de N-(4-(2-(aminoxi)etil)fenil)pent-4-inamida de disolución madre (véase el Ejemplo 5 a continuación). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 16 h. Se concentraron los productos de reacción y se evaporaron conjuntamente con tolueno (3x2 ml) para proporcionar un sólido amarillento (~20 mg).

15 **Ejemplo 4: Preparación de heparina degradada con ácido nitroso funcionalizada con azida y heparina natural con enlace de cadena de PEG.**



#### Preparación de compuestos intermedios

##### 4-azidobutirato de N hidroxisuccinimidilo

- 5 Se preparó el derivado de ácido 4-azidobutírico según procedimientos publicados (N. Khoukhi, M. Vaultier, R. Carrie, *Tetrahedron*, 1.987, **43** (8) 1.811 – 1.822) seguido por activación de N-hidroxisuccinimida (R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpane, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *Journal of the American Chemical Society*, 2.007, **129** (21) 6.859 -6.864).

##### Espaciador de PEG largo bifuncionalizado de $\omega$ -Azido ( $x \sim 40$ , véase anteriormente)

- 10 A una disolución de PEG funcionalizado de diamino (O,O'-Bis(2-aminopropil)polipropilenglicol-bloque-poli(etilenglicol)-bloque-polipropilenglicol 1900) (7,2 g;  $\sim 3,8$  mmoles;  $x \sim 40$ ) en 15 ml de diclorometano (DCM) se añadió 4-azidobutirato de N-hidroxisuccinimidilo (2,0 g,  $\sim 8,85$  mmoles). Se agitó una mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche, después se diluyó con DCM y se lavó con posterioridad con HCl 1 M,  $\text{NaHCO}_3$  (sat.) y salmuera. Secando ( $\text{MgSO}_4$ ), la concentración y secado a vacío produjo aproximadamente 8 g de un sólido ligeramente amarillo. La identificación del producto de reacción con TLC y MALDI mostró los resultados esperados.

- 15 Espaciador de PEG pequeño bifuncionalizado de  $\omega$ -Azido ( $x \sim 11$ , véase anteriormente)

- 20 A una disolución de PEG funcionalizado de diamino (O,O'-Bis(2-aminopropil)polipropilenglicol-bloque-poli(etilenglicol)-bloque-polipropilenglicol 500) (2,4 g;  $\sim 3,9$  mmoles;  $x \sim 11$ ) en 10 ml de diclorometano (DCM) se añadió 4-azidobutirato de N-hidroxisuccinimidilo (2,0 g,  $\sim 8,85$  mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche, después se diluyó con DCM y se lavó con posterioridad con HCl 1 M,  $\text{NaHCO}_3$  (sat.) y salmuera. Secando ( $\text{MgSO}_4$ ), la concentración y secado a vacío produjo aproximadamente 3,1 g de un producto oleoso. La identificación del producto de reacción con TLC y MALDI mostró los resultados esperados.

#### Preparación de heparina funcionalizada de azido con espaciador (funcionalidad inversa).

- 25 Ejemplo 4a: El PEG pequeño bifuncionalizado de  $\omega$ -azido (800 mg,  $\sim 1,0$  mmol) se disolvió en agua desionizada (35 ml), después se añadió heparina degradada con ácido nitroso funcionalizada de alquino (500 mg,  $\sim 0,1$  mmoles), véase el Ejemplo 3a, junto con  $\text{CuSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (100 mg) y ascorbato de sodio (160 mg). Se agitó después la mezcla de reacción durante 2 días seguido por diálisis durante 3 días contra agua purificada con una membrana de diálisis SpectraPor PML 1 kD (anchura plana 45 mm longitud 50 cm). Se filtró el producto dializado en aproximadamente 200 ml de agua por una placa de filtro de 20  $\mu\text{m}$  y se liofilizó para proporcionar 620 mg. La actividad de la heparina degradada con ácido nitroso funcionalizada de azida con espaciador PEG pequeño fue 96 UI/mg (calculado

basándose en la parte carbohidrato) que indica que la actividad de la heparina funcionalizada no se ve afectada sustancialmente por funcionalización.

5 Ejemplo 4b: El PEG largo bifuncionalizado de  $\omega$ -azido (2,0 g,  $\sim$ 1,0 mmol) se disolvió en agua desionizada (20 ml), después se añadió heparina degradada con ácido nitroso funcionalizada de alquino (500 mg,  $\sim$ 0,1 mmol), véase el Ejemplo 3a, junto con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (100 mg) y ascorbato de sodio (160 mg). Se agitó después la mezcla de reacción durante 2 días seguido por diálisis durante 3 días contra agua purificada con una membrana de diálisis SpectraPor PML 1 kD (anchura plana 45 mm longitud 50 cm). Se liofilizó el producto dializado en aproximadamente 600 ml de agua para proporcionar 1,8 g. La actividad de la heparina degradada con ácido nitroso funcionalizada de azida con espaciador PEG largo fue 93 UI/mg (calculado basándose en la parte carbohidrato) que indica que la actividad de la heparina funcionalizada no se ve afectada sustancialmente por funcionalización.

15 Ejemplo 4c: El PEG pequeño bifuncionalizado de  $\omega$ -azido (800 mg,  $\sim$ 1,0 mmol) se disolvió en agua desionizada (35 ml), después se añadió heparina natural funcionalizada de alquino (1,0 g,  $\sim$ 0,1 mmol), véase el Ejemplo 3b, junto con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (100 mg) y ascorbato de sodio (160 mg). Se agitó después la mezcla de reacción durante 2 días seguido por diálisis durante 3 días contra agua purificada con una membrana de diálisis SpectraPor PML 1 kD (anchura plana 45 mm longitud 50 cm). Se filtró el producto dializado en aproximadamente 200 ml de agua por una placa de filtro de 20  $\mu\text{m}$  y se liofilizó para proporcionar 900 mg. La actividad de la heparina natural funcionalizada de azida con espaciador PEG pequeño no se midió.

20 Ejemplo 4d: El PEG largo bifuncionalizado de  $\omega$ -azido (1,0 g,  $\sim$ 0,5 mmoles) se disolvió en agua desionizada (15 ml), después se añadió heparina natural funcionalizada de alquino (450 mg,  $\sim$ 0,05 mmoles), véase el Ejemplo 3b, junto con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (50 mg) y ascorbato de sodio (80 mg). Se agitó después la mezcla de reacción durante 2 días seguido por diálisis durante 3 días contra agua purificada con una membrana de diálisis SpectraPor PML 1 kD (anchura plana 45 mm longitud 40 cm). Se liofilizó el producto dializado en aproximadamente 100 ml de agua para proporcionar 840 mg. La actividad de la heparina natural funcionalizada de azida con espaciador de PEG largo fue 181 UI/mg (calculado basándose en la parte carbohidrato) que indica que la actividad de la heparina funcionalizada no se ve afectada sustancialmente por funcionalización.

Ejemplo 5: Ligador bifuncional

5 a) N-(4-(2-(hidroxi)etil)fenil)pent-4-inamida

30 Se disolvieron (4-pentinoato) de N-hidroxisuccinimida (Ref: Malkoch, M.; Schleicher, K.; Drockenmuller, E.; Hawker, C. J.; Russell, T. P.; Wu, P.; Fokin, V. V., Structurally Diverse Dendritic Libraries: A Highly Efficient Functionalization Approach Using Click Chemistry. *Macromolecules* 2.005, 38, (9), 3.663-3.678.) (200 mg, 1,0 mmol) y p-aminofeniletanol (125 mg, 0,9 mmoles) en 2 ml de diclorometano junto con trietilamina (140  $\mu\text{l}$ , 1,0 mmol) y 5 gotas de dimetilformamida. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró el producto de reacción bruto, se disolvió en 10 ml de acetato de etilo y se lavó con 5 ml de agua seguido por 5 ml de HCl (ac.) 0,5 M, 5 ml de 10  $\text{NaHCO}_3$  (ac.) y finalmente 5 ml de agua. Se secó la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó además el producto por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de tolueno (T) y acetato de etilo (E) de 4:1 a 1:2 (T:E). El producto N-(4-(2-(hidroxi)etil)fenil)pent-4-inamida se caracterizó por RMN y MALDI-TOF.

5 b) N-(4-(2-(metanosulfonato)etil)fenil)pent-4-inamida

40 Se disolvió N-(4-(2-(hidroxi)etil)fenil)pent-4-inamida (210 mg, 1,0 mmol) en 4 ml de piridina. Se añadió cloruro de metanosulfonilo ( $\text{MsCl}$ ) (100  $\mu\text{l}$ , 1,3 mmoles) a 0°C. Se volvió a llevar la reacción agitada a temperatura ambiente y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 5 min. Se evaporó el disolvente y se volvió a disolver el residuo en 10 ml de acetato de etilo y se lavó con 5 ml de agua seguido por 5 ml de HCl (ac.) 0,1 M y finalmente 5 ml de agua. Se secó la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó el disolvente para proporcionar el producto N-(4-(2-(metanosulfonato)etil)fenil)pent-4-inamida.

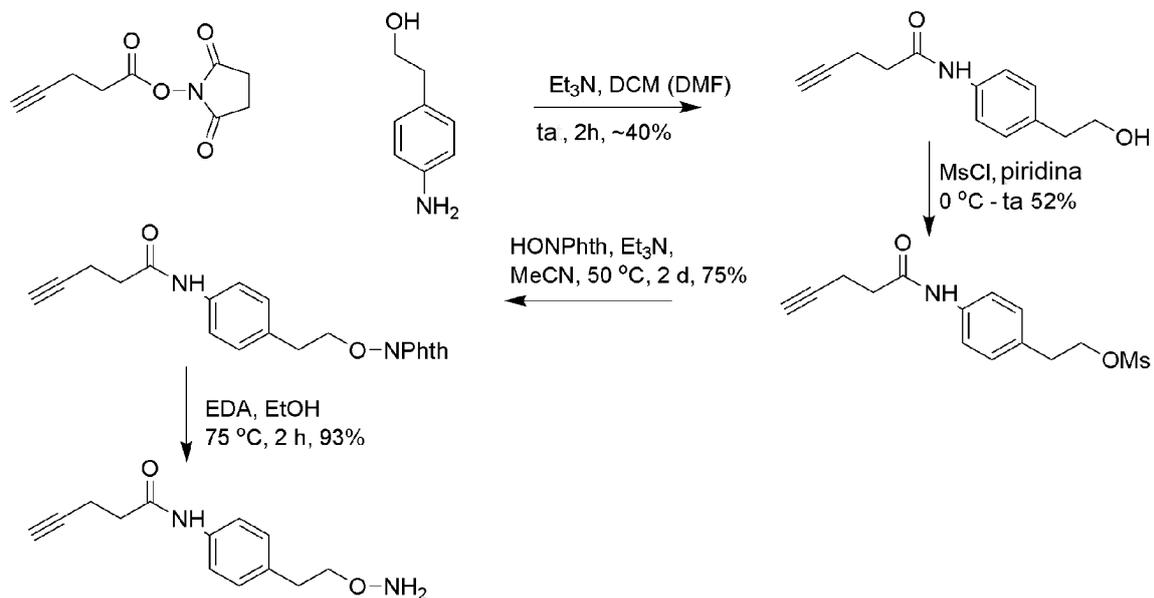
45 5 c) N-(4-(2-(N-oxifitalimido)etil)fenil)pent-4-inamida

50 Se disolvió la N-(4-(2-(metanosulfonato)etil)fenil)pent-4-inamida en 6 ml de acetonitrilo y se añadió a una disolución de N-hidroxiifalimida (200 mg, 0,9 mmoles) y trietilamina (250  $\mu\text{l}$ , 1,8 mmoles) en 2 ml de acetonitrilo. Se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 2 días. Después se diluyó la mezcla de reacción con 40 ml de acetato de etilo y se lavó con 20 ml de HCl (ac.) 0,5 M, 5x30 ml de 10  $\text{NaHCO}_3$  (ac.) para eliminar el color rojo, y finalmente 5 ml de agua. Se secó la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó el disolvente. Se volvió a cristalizar el producto bruto de 10 ml de tolueno para obtener N-(4-(2-(N-oxifitalimido)etil)fenil)pent-4-inamida que se caracterizó por RMN y MALDI-TOF.

5 d) N-(4-(2-(aminoxi)etil)fenil)pent-4-inamida

55 Se disolvió N-(4-(2-(N-oxifitalimido)etil)fenil)pent-4-inamida (20 mg, 5,5  $\mu\text{moles}$ ) y etilendiamina (200  $\mu\text{l}$ , 3,0 mmoles) en 2 ml de etanol. Se agitó la reacción a 75°C durante 2 horas. Se evaporó el disolvente y se purificó el producto bruto por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de tolueno (T) y acetato de etilo

(E) de 2:1 a 1:3 (T:E). El producto N-(4-(2-(aminoxi)etil)fenil)pent-4-inamida se caracterizó por RMN y MALDI-TOF.



Preparación de disolución madre:

- Se puso N-(4-(2-(aminoxi)etil)fenil)pent-4-inamida (2,5 mg) en un matraz métrico y se añadió acetonitrilo (1.000  $\mu\text{l}$ ) para disolver el ligador.

**REIVINDICACIONES**

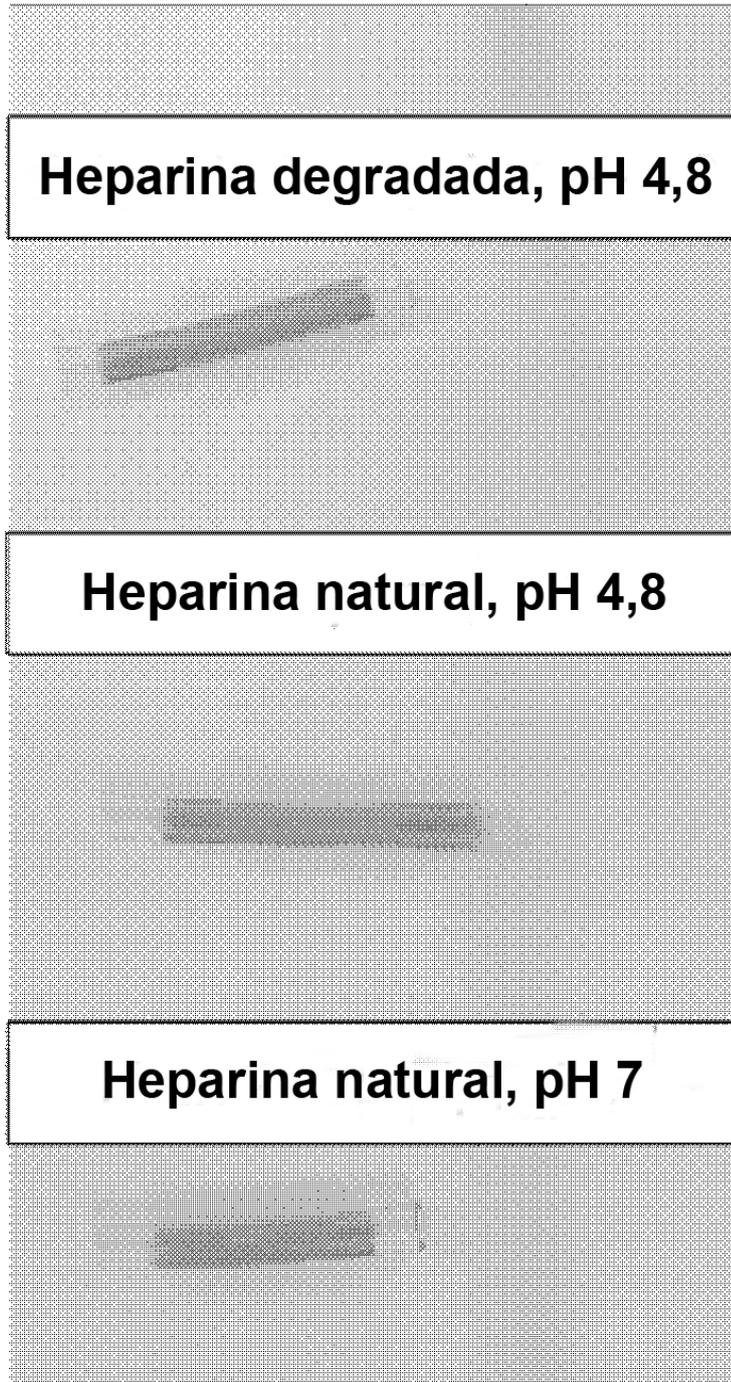
1. Un producto sanitario no trombogénico que tiene una superficie que comprende una capa de recubrimiento, siendo dicha capa de recubrimiento una composición biocompatible que comprende una capa externa de polímero catiónico funcionalizado, según lo cual un resto heparina está unido al punto del extremo mediante enlaces covalentes a través de su extremo reductor a la capa externa de polímero catiónico mediante un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.
2. Un dispositivo según la reivindicación 1, en el que el resto heparina es una heparina de longitud total.
3. Un dispositivo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la superficie comprende dos o más capas de recubrimiento, estando unida sólo la capa de recubrimiento externa al resto heparina.
4. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la superficie comprende una o más bicapas de recubrimiento de polímero catiónico y polímero aniónico, siendo la capa más interna una capa de polímero catiónico y siendo la capa más externa una capa de polímero catiónico unida mediante enlaces covalentes al resto heparina.
5. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una multiplicidad de enlaces del mismo tipo.
6. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que más de un resto heparina está unido a cada enlace.
7. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el recubrimiento comprende una poliamina como polímero catiónico.
8. Un dispositivo según la reivindicación 7, en el que el recubrimiento comprende una capa de una poliamina de peso molecular promedio alto y una capa de un polisacárido aniónico como polímero aniónico.
9. Un dispositivo según las reivindicaciones 7 u 8, en el que la poliamina es reticulada.
10. Un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, dispositivo que presenta una actividad de unión de antitrombina III de al menos 2 picomoles de antitrombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm<sup>2</sup>) de superficie.
11. Un producto sanitario no trombogénico según la reivindicación 1, que se puede obtener por un procedimiento que comprende:
  - (a) tratar un producto sanitario para presentar una capa de superficie de polímero catiónico que ha sido funcionalizado para soportar grupos azido;
  - (b) hacer reaccionar dicha capa superficial de polímero catiónico que ha sido funcionalizado para soportar grupos azido con un resto heparina que es funcionalizado en su extremo reductor para soportar un grupo alquino;
 para unir de ese modo el resto heparina al dispositivo a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.
12. Un producto sanitario no trombogénico según la reivindicación 1, que se puede obtener por un procedimiento que comprende:
  - (a) tratar un producto sanitario para que presente una capa superficial de polímero catiónico que haya sido funcionalizado para soportar grupos alquino;
  - (b) hacer reaccionar dicha capa superficial de polímero catiónico que ha sido funcionalizado para soportar grupos alquino con un resto heparina que es funcionalizado en su extremo reductor para soportar un grupo azido;
 para unir de ese modo el resto heparina al dispositivo a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.
13. Un producto sanitario no trombogénico según la reivindicación 1 que se puede obtener:
  - (l) por un procedimiento que comprende:
    - (a) tratar un producto sanitario para que presente una capa superficial de polímero catiónico;
    - (b) asociar a dicha capa superficial de polímero catiónico un polímero catiónico funcionalizado que soporta una pluralidad de restos heparina cargados de manera negativa que están unidos al mismo en sus extremos reductores vía un enlace que comprende un 1,2,3-triazol, soportando dicho polímero catiónico funcionalizado una pluralidad de restos heparina cargados de manera negativa con una carga negativa neta;

o

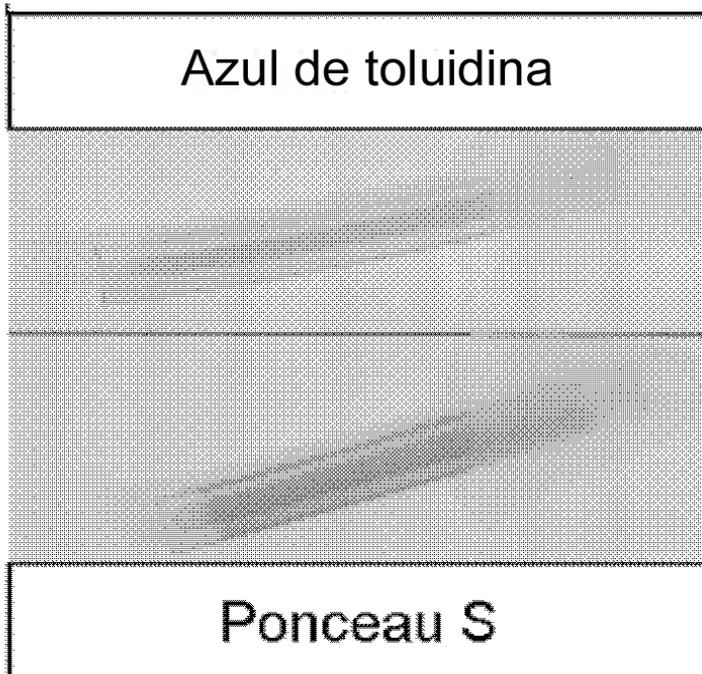
(II) por un procedimiento que comprende:

- (a) tratar un producto sanitario para que presente una capa superficial de polímero aniónico;
  - (b) asociar a dicha capa superficial de polímero aniónico un polímero catiónico funcionalizado que soporta una pluralidad de restos heparina cargados de manera negativa que están unidos al mismo en sus extremos reductores vía un enlace que comprende un 1,2,3-triazol, soportando dicho polímero catiónico funcionalizado una pluralidad de restos heparina cargados de manera negativa con una carga positiva neta;
14. Un producto sanitario no trombogénico según la reivindicación 13, en el que en el procedimiento (II), el polímero aniónico de sulfato de dextrano o un derivado del mismo.
15. Un producto sanitario no trombogénico según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que el polímero catiónico es una poliamina.
16. Un producto sanitario no trombogénico según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el resto heparina es un resto heparina de longitud completa.
17. Un procedimiento para la producción de un producto sanitario según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, procedimiento que comprende la reacción de un resto heparina que soporta un grupo alquino en su extremo reductor con una correspondiente superficie que soporta un grupo azido o la reacción de un resto heparina que soporta un grupo azido en su extremo reductor con una correspondiente superficie que soporta un grupo alquino.
18. Un procedimiento según la reivindicación 17, en el que el dispositivo presenta una superficie que comprende una o más capas de polisacárido y poliamina, procedimiento que comprende la reacción de una superficie que tiene una capa externa de polisacárido con una poliamina que soporta resto heparina unido a la poliamina en su extremo reductor a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol o la reacción de una superficie que tiene una capa externa de polisacárido con una poliamina que soporta un grupo azida o alquino y haciendo reaccionar el producto resultante con resto heparina que soporta un grupo alquino o azido, respectivamente, en su extremo reductor.
19. Un resto heparina capaz de interaccionar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o formación de trombo, cuya entidad soporta un alquino o un grupo azido, grupo alquino o azido que está unido a un ligador, en el que el ligador está unido en el punto del extremo al resto heparina a través de su extremo reductor.
20. Una poliamina funcionalizada que soporta un resto heparina, en la que el resto heparina está unido en su extremo reductor a la poliamina a través de un enlace que comprende un 1,2,3-triazol.

**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

