

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 602**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34	(2006.01)
A61L 27/54	(2006.01)
A61L 29/08	(2006.01)
A61L 29/16	(2006.01)
A61L 31/10	(2006.01)
A61L 31/16	(2006.01)
A61L 33/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2007 PCT/US2007/011441**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2007 WO07133699**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2007 E 07777001 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2023967**

54 Título: **Entidades biológicamente activas inmovilizadas que tienen un alto grado de actividad biológica después de manipulación mecánica o esterilización**

30 Prioridad:

12.05.2006 US 433250
12.05.2006 US 433105
10.05.2007 US 747163
10.05.2007 US 747162

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2017

73 Titular/es:

W. L. GORE & ASSOCIATES, INC. (100.0%)
555 Paper Mill Road
Newark, DE 19711, US

72 Inventor/es:

CLEEK, ROBERT, L.;
DALY, MICHAEL, D. y
PIETRZAK, KRZYSZTOF, R.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 623 602 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 biológicamente activas inmovilizadas que tienen un alto grado de actividad biológica después de manipulación mecánica o esterilización

Campo de la invención

- 5 La presente invención se dirige a materiales de sustrato que tienen entidades biológicamente activas inmovilizadas que mantienen su actividad biológica después de exposición a condiciones de calor elevado, alta humedad, agentes antibióticos, y/o tensiones mecánicas. La presente invención es particularmente útil en el campo de los dispositivos médicos.

Antecedentes de la invención

- 10 En el campo de los dispositivos médicos, los materiales de vidrio, poliméricos, y/o metálicos son materiales comunes para sustratos. Estos materiales se pueden utilizar para dispositivos de diagnóstico o dispositivos extracorpóreos. Con la excepción del vidrio, muchos de los materiales se pueden utilizar para dispositivos implantables.

- 15 La inmovilización de entidades biológicamente activas sobre materiales de sustrato en una forma biológicamente activa implica una apreciación de las respectivas propiedades químicas de la entidad y del material de sustrato. La modificación de la composición química de un material de sustrato es necesaria a menudo para inmovilizar una entidad biológicamente activa sobre el mismo. Esto se consigue normalmente mediante el tratamiento de las superficies del material de sustrato para generar una población de elementos o grupos químicamente reactivos, seguido por la inmovilización de la entidad biológicamente activa con un protocolo apropiado. Con otros materiales de sustrato, las superficies de un material de sustrato se revisten, o recubren, con un material que tiene grupos químicos reactivos incorporados. Las entidades biológicamente activas se inmovilizan entonces sobre el material de sustrato a través de los grupos químicos reactivos del material de recubrimiento. Se han descrito una variedad de esquemas para revestir, o recubrir, materiales de sustrato. Ejemplos representativos de entidades biológicamente activas inmovilizadas sobre un material de sustrato con un material de revestimiento, o recubrimiento, se describen en las patentes de Estados Unidos Números: 4.810.784; 5.213.898; 5.897.955; 5.914.182; 5.916.585; y 6.461.665.

- 25 Cuando se inmovilizan compuestos, composiciones, o entidades biológicamente activas, la actividad biológica de estos "productos biológicos" se puede ver afectada negativamente por el procedimiento de inmovilización. La actividad biológica de muchos de los productos biológicos es dependiente de la conformación (esto es, primaria, secundaria, terciaria, etc.) del producto biológico en su estado inmovilizado. Además de un procedimiento de inmovilización cuidadosamente seleccionado, pueden ser necesarias alteraciones químicas del producto biológico para que el producto biológico sea incorporado en el material de recubrimiento con una conformación que haga que el producto biológico sea suficientemente activo para realizar su función prevista.

- 35 A pesar de un esquema optimizado de recubrimiento e inmovilización, el procesamiento adicional, tal como la esterilización, puede degradar la actividad biológica del producto biológico inmovilizado. Para los dispositivos médicos implantables, es necesaria la esterilización antes de su uso. La esterilización también puede ser necesaria para los dispositivos de diagnóstico *in vitro* que son sensibles a los contaminantes. La esterilización de tales dispositivos normalmente requiere la exposición de los dispositivos a temperatura, presión y humedad elevadas, a menudo durante varios ciclos. En algunos casos, se incluyen agentes antibióticos, tales como óxido de etileno gas (ETO) o vapor de peróxido de hidrógeno en el procedimiento de esterilización. Además de la esterilización, la compactación y la expansión mecánicas, o el almacenamiento a largo plazo de un producto biológico inmovilizado, pueden degradar la actividad del producto biológico.

El documento EP1559434A1 (Ethicon, Inc.) describe un método de una sola etapa para la modificación de la superficie, el injerto y la esterilización de los recubrimientos bio-activos sobre los materiales y biomateriales utilizados en dispositivos médicos, incluidos los stents recubiertos de heparina-

- 45 El documento EP09239953A2 (Schneider Inc. (USA)) describe un recubrimiento en capas relativamente finas de material elastomérico bioestable que contiene una cantidad de material biológicamente activo dispersada en el mismo en combinación con una superficie no trombogénica que se dice que es útil para recubrir las superficies de prótesis tales como los stents despleables

- 50 El documento WO98/08552 (Medtronic Inc.) describe un método de fabricación de un dispositivo médico que tiene heparina inmovilizada sobre una superficie de contacto con la sangre en la que la superficie heparinizada unida covalentemente está provista de una proteína adsorbida que puede ser activada por la heparina inmovilizada para bloquear la coagulación del fibrinógeno.

Harchammer *et. al.*, (Circulation, 1996, Vol. 93, N° 3, pp 423-430) describe un estudio en el que el recubrimiento de stents metálicos con heparina redujo los accidentes trombóticos asociados con su utilización en arterias coronarias normales de cerdos.

- 55 Lin *et. al.*, (Laboratory Investigations, May 2003, Vol. 14, N° 5, pp 603-611) examinó el efecto de la colocación de un

stent iliaco expandible por balón recubierto con heparina, sobre la hiperplasia de la íntima en un modelo de babuino.

Existe una necesidad de dispositivos médicos que tengan entidades biológicamente activas inmovilizadas sobre los mismos que puedan ser sometidos a esterilización, compactación y expansión mecánicas, y/o almacenamiento sin pérdida significativa de actividad biológica. Un dispositivo médico de este tipo debe tener composiciones o compuestos biológicamente compatibles incluidos con las entidades biológicas inmovilizadas que sirven para minimizar la degradación de la actividad biológica de las entidades durante la esterilización, la compactación y la expansión mecánicas, y/o el almacenamiento. En algunos casos, las composiciones o compuestos biológicamente compatibles adicionales pueden aumentar la actividad biológica de algunas entidades biológicamente activas después de un procedimiento de esterilización.

10 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a dispositivos médicos que tienen materiales de sustrato con entidades biológicamente activas inmovilizadas sobre ellos, en combinación con composiciones químicas orgánicas biológicamente compatibles adicionales que hacen posible que las entidades biológicamente activas mantengan una actividad biológica importante después de la exposición de las entidades inmovilizadas a las condiciones de procesado y almacenamiento que de otra manera pueden degradar la actividad biológica de las entidades.

Un material de sustrato adecuado puede ser cualquier material con una superficie que tiene grupos químicos reactivos que son capaces de unir, confinar, o inmovilizar de otro modo una entidad biológicamente activa en una forma biológicamente activa sobre una o más superficies del material de sustrato. Los materiales de sustrato pueden tener también una multiplicidad de grupos químicos reactivos añadidos a las superficies de los materiales a través de la aplicación de una o más composiciones o materiales de recubrimiento, a las superficies. Al menos una porción de un material de recubrimiento tiene elementos, grupos, compuestos o componentes químicos que son reactivos para las entidades biológicamente activas y sirven para unir, confinar, o inmovilizar de otro modo una entidad biológicamente activa en una forma biológicamente activa sobre el material de recubrimiento. En algunas realizaciones, la entidad biológicamente activa puede ser inmovilizada de manera reversible.

Al menos un tipo de entidad biológicamente activa que es un oligosacárido o polisacárido se une químicamente, se confina, o se inmoviliza de otro modo, con grupos químicos reactivos adecuados sobre el material de sustrato y/o el material de recubrimiento. Después de la inmovilización de una pluralidad de dichas entidades biológicamente activas con al menos una porción de una multiplicidad de grupos químicos reactivos presentes sobre un material de sustrato y/o material de recubrimiento, una composición orgánica biológicamente compatible adicional que es un polisacárido que es un glucosaminoglucano, dextrano o sulfato de dextrano, se combina de manera no covalente con las entidades biológicamente activas, el sustrato, y/o el material de recubrimiento polimérico. La composición orgánica biológicamente compatible interactúa con las entidades biológicamente activas y los grupos químicos reactivos del material de sustrato y/o material de recubrimiento para evitar que las entidades biológicamente activas pierdan la actividad biológica en condiciones que de otro modo podrían degradar significativamente la actividad biológica de las entidades. Estas condiciones incluyen la esterilización y el almacenamiento. Con los dispositivos médicos endoluminales expandibles, por ejemplo, la compactación y la expansión mecánicas de tales dispositivos también pueden degradar significativamente la actividad biológica de las entidades.

En algunos casos, la composición orgánica biológicamente compatible adicional parece mantener la actividad biológica de las entidades durante la esterilización, almacenamiento y/o manipulación mecánica, al limitar las alteraciones indeseables de las entidades frecuentemente inducidas por la esterilización, almacenamiento, y/o proceso de manipulación mecánica. Las alteraciones que disminuyen la actividad pueden incluir cambios conformacionales de una entidad biológicamente activa que ocultan un sitio activo de la entidad. Las alteraciones que disminuyen la actividad, también pueden incluir interacciones entre entidades biológicamente activas vecinas. Los reordenamientos de entidades biológicamente activas con respecto a un material de recubrimiento polimérico son otras alteraciones posibles que disminuyen la actividad de las entidades. La simple desnaturalización, u otra degradación, de las entidades biológicamente activas puede ser otro medio por el cual las entidades pierden actividad biológica. Como se describe en mayor detalle en la presente memoria, las entidades biológicamente activas inmovilizadas esterilizadas, almacenadas, y/o manipuladas mecánicamente en presencia de la composición orgánica biológicamente compatible adicional pueden mantener un grado de actividad biológica significativamente mayor que una entidad biológicamente activa inmovilizada similar procesada en las mismas condiciones en ausencia de la composición orgánica biológicamente compatible adicional.

La composición orgánica biológicamente compatible adicional puede ser eliminada de un dispositivo médico esterilizado durante el procesamiento posterior a la esterilización o la composición puede ser eliminada por los procesos fisiológicos del receptor de un implante después de la utilización del dispositivo médico esterilizado en un sitio de implantación.

Las entidades biológicamente activas preferidas que son oligosacáridos o polisacáridos reducen o inhiben la formación de trombos en las superficies de un sustrato y/o material de recubrimiento. Los glucosaminoglucanos son agentes antitrombóticos preferidos para uso en la presente invención, siendo particularmente preferidos la heparina, análogos de heparina y derivados. Se describen también sustancias biológicamente activas que reducen el

crecimiento celular indeseable del tejido en el que se implanta la presente invención. Los agentes anti-proliferativos incluyen, pero no se limitan a dexametasona, rapamicina, y paclitaxel.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un dispositivo médico que comprende un material de sustrato, un material de recubrimiento polimérico unido a al menos una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de entidades biológicamente activas que tienen actividad de unión a la anti-trombina III unidas covalentemente a al menos una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, siendo dichas entidades biológicamente activas oligosacáridos o polisacáridos y una composición orgánica biológicamente compatible que es un polisacárido, combinada con dicho material de recubrimiento polimérico, siendo dicho polisacárido un glucosaminoglucano, dextrano o sulfato de dextrano, en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 5 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato después de la esterilización o compactación y expansión de dicho material de sustrato. En otras realizaciones, la actividad de unión a la anti-trombina es de al menos 6 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, al menos 7 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, al menos 8 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, al menos 9 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, o al menos 10 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato. En algunas realizaciones, la actividad de unión a la anti-trombina III es de al menos 100 pmol/cm^2 , picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato.

Se describe también un dispositivo médico que comprende un material de sustrato, un material de recubrimiento polimérico unido a al menos una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una primera pluralidad de moléculas de heparina que tienen actividad de unión a la anti-trombina III, unidas en el punto extremo a al menos una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, y una composición biológicamente compatible combinada con dicho material de recubrimiento polimérico, en donde dicha primera pluralidad de moléculas de heparina, tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 10 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.

Se describe también un dispositivo médico esterilizado que comprende un material de sustrato polimérico, un material de recubrimiento polimérico unido a al menos una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de moléculas de heparina que tienen actividad de unión a la anti-trombina III unidas en el punto extremo a al menos una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, y una composición que comprende una pluralidad de moléculas de polietilenglicol combinadas con dicho material de recubrimiento polimérico, en donde dicha primera pluralidad de moléculas de heparina, tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 50 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.

Se describe también un dispositivo médico que comprende un material de sustrato, una pluralidad de entidades químicas que tienen actividad de unión a la anti-trombina III presentes sobre al menos una porción de dicho material de sustrato, una primera composición biológicamente compatible combinada con dicho material de sustrato, y una segunda composición biológicamente compatible mezclada con la misma.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a un dispositivo médico que comprende un material de sustrato, un material de recubrimiento polimérico unido a al menos una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de entidades químicas que tienen actividad de unión a la anti-trombina III presentes sobre al menos una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, una primera composición biológicamente compatible combinada con dicho material de sustrato, y una segunda composición biológicamente compatible mezclada con la misma.

En las realizaciones que se refieren a composiciones orgánicas biológicamente compatibles combinadas de forma no covalente, al menos una porción de la composición orgánica o la segunda pluralidad de moléculas de heparina se libera a menudo del dispositivo médico esterilizado o manipulado mecánicamente en varias horas cuando se coloca en una solución tampón de fosfato 0,15 M con una temperatura de aproximadamente treinta y siete grados centígrados y un pH sustancialmente neutro. La presencia de los compuestos liberados se puede detectar en la solución tampón con técnicas de ensayo rutinarias.

En algunas realizaciones, la composición orgánica biológicamente compatible se puede mezclar antes de la manipulación mecánica y/o de la esterilización. En otras realizaciones, la composición orgánica biológicamente compatible se puede mezclar después de la manipulación mecánica o de la esterilización. (esto es, en una sala de operaciones). Esto es particularmente útil cuando la composición orgánica se puede degradar a través de la manipulación mecánica o esterilización de un sustrato o dispositivo que utiliza la composición. Esto permite también que la composición orgánica sea colocada en sitios particulares sobre un sustrato o dispositivo y en dosis variables.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene una multiplicidad de grupos químicos reactivos sobre el mismo.

- La Figura 1A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico.
- La Figura 2 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo.
- 5 La Figura 3 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una multiplicidad de grupos químicos reactivos sobre el mismo.
- La Figura 3A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una multiplicidad de grupos químicos reactivos sobre el mismo.
- La Figura 4 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo.
- 10 La Figura 4A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo.
- La Figura 5 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellas.
- 15 La Figura 6 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellas.
- La Figura 6A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellas.
- 20 La Figura 6B es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo que muestra algo de la composición biológicamente compatible ilustrada en la Figura 6 que ha sido liberado del material de sustrato y del material de recubrimiento polimérico.
- 25 La Figura 6C es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo que muestra algo de la composición biológicamente compatible ilustrada en la Figura 6A que ha sido liberado del material de sustrato y del material de recubrimiento polimérico.
- 30 La Figura 7 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene tres capas de material de recubrimiento polimérico aplicadas al mismo con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellas.
- La Figura 7A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene tres capas de material de recubrimiento polimérico aplicadas al mismo con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellas.
- 35 La Figura 7B es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene tres capas de material de recubrimiento polimérico aplicadas al mismo con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo que muestra algo de la composición biológicamente compatible ilustrada en la Figura 7 que ha sido liberado del material de sustrato y del material de recubrimiento polimérico.
- 40 La Figura 7C es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene tres capas de material de recubrimiento polimérico aplicadas al mismo con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo que muestra algo de la composición biológicamente compatible ilustrada en la Figura 7A que ha sido liberado del material de sustrato y del material de recubrimiento polimérico.
- La Figura 8 es un gráfico de barras que ilustra cómo la esterilización de la heparina sin unir no reduce significativamente la actividad biológica de la heparina.
- 45 La Figura 9 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una variedad de composiciones orgánicas biológicamente compatibles sobre la actividad biológica de la heparina unida en el punto extremo inmovilizada a grupos químicos reactivos sobre un material de recubrimiento polimérico durante y después de la exposición de la heparina inmovilizada a un régimen de esterilización con óxido de etileno.
- 50 La Figura 10 es un gráfico de barras que ilustra la capacidad de las composiciones orgánicas biológicamente compatibles de heparina o sulfato de dextrano añadidas para dar como resultado altos niveles de actividad de unión a la ATIII de la heparina inmovilizada en un material de recubrimiento polimérico sobre un sustrato durante y después de la exposición de la heparina inmovilizada a un régimen de esterilización con óxido de etileno.

La Figura 11 es un gráfico de barras que ilustra la capacidad del sulfato de dextrano añadido para mantener la actividad biológica de la heparina unida en el punto extremo inmovilizada sobre un sustrato recubierto con alcohol polivinílico durante y después de la exposición de la heparina inmovilizada a un régimen de esterilización con óxido de etileno.

- 5 La Figura 12 es un gráfico de barras que ilustra la capacidad del glicerol añadido para mantener la actividad biológica de la heparina unida en el punto extremo inmovilizada sobre un material de recubrimiento polimérico de un sustrato después de la compactación y expansión del material de sustrato.

La Figura 13 es un gráfico de barras que ilustra la capacidad del glicerol y la heparina añadidos para mantener la actividad biológica de la heparina unida en el punto extremo inmovilizada sobre un material de recubrimiento polimérico de un sustrato después de la compactación mecánica, la exposición a un régimen de esterilización con óxido de etileno, y la expansión mecánica del material de sustrato.

10

La Figura 14 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y grupos químicos reactivos sobre el mismo.

- 15 La Figura 15 es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y grupos químicos reactivos sobre el mismo.

La Figura 16 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas y una composición biológicamente compatible adicional combinada covalentemente con el mismo.

20

La Figura 17 es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas y una composición biológicamente compatible adicional combinada covalentemente con el mismo.

- 25 La Figura 18 es una representación esquemática de realizaciones de la presente invención que tienen una segunda composición biológicamente compatible adicional combinada con las mismas.

La Figura 19 es una representación esquemática de realizaciones de la presente invención que tienen una segunda composición biológicamente compatible combinada con las mismas.

La Figura 20 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo, una primera composición biológicamente compatible y una segunda composición biológicamente compatible combinadas con ellas.

30

La Figura 21 es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo, una primera composición biológicamente compatible y una segunda composición biológicamente compatible combinadas con ellas.

35

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a materiales y dispositivos que tienen entidades biológicamente activas inmovilizadas en ellos que mantienen una actividad biológica significativa después de las condiciones de esterilización, compactación y expansión mecánicas, y/o almacenamiento que de otro modo podrían disminuir significativamente la actividad biológica de las entidades. La actividad biológica de una entidad biológica inmovilizada sometida a tales condiciones puede estar influenciada positivamente por la presencia de al menos una composición biológicamente compatible adicional combinada de forma no covalente con las entidades biológicamente activas. La composición adicional es un compuesto orgánico. En realizaciones preferidas, la composición adicional es un glucosaminoglucano. Los glucosaminoglucanos preferidos son composiciones de heparina, análogos de heparina, y derivados de heparina.

40

45

Con referencia a las figuras 1 y 2, algunos materiales de sustrato polimérico (12) tienen multiplicidades de grupos químicos reactivos (16) que pueblan al menos una parte de las superficies de los materiales de sustrato a los que una pluralidad de entidades biológicamente activas (17), están unidas, confinadas, o inmovilizadas de otra forma. La mayor parte de las entidades biológicamente activas (17) están unidas covalentemente, o enlazadas, a los materiales de sustrato (12) a través de los grupos químicos reactivos (16). Las superficies del material de sustrato polimérico (12) pueden ser lisas, rugosas, porosas, curvadas, planas, angulares, irregulares, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, los materiales de sustrato con poros en la superficie tienen espacios vacíos internos que se extienden desde la superficie porosa del material hasta el cuerpo del material. Estos materiales de sustrato poroso tienen material de sustrato interno que limita los poros que a menudo proporciona superficies susceptibles de inmovilizar entidades biológicamente activas. Ya sean porosos o no porosos, los materiales de

50

55

sustrato pueden estar en la forma de filamentos, películas, láminas, tubos, mallas, tejidos, no tejidos, y combinaciones de los mismos.

Los materiales de sustrato adecuados (12) para la inmovilización de entidades biológicamente activas (17) incluyen materiales poliméricos biocompatibles tales como polietileno, poliuretano, silicona, polímeros que contienen poliamida y polipropileno. El politetrafluoroetileno de densidad completa o poroso es un material de sustrato polimérico adecuado (12) si se introducen grupos químicos reactivos (16) en constituyentes del material polimérico. Los materiales de sustrato con una multiplicidad de grupos químicos reactivos que son parte del material de sustrato se denominan aquí "materiales funcionalizables". Después de la reacción de una entidad biológicamente activa con un material de sustrato funcionalizable, el material de sustrato se considera funcionalizado y la entidad biológicamente activa inmovilizada. Con el fin de mantener la actividad biológica de la entidad inmovilizada durante las condiciones de procesamiento posteriores, tales como la esterilización, compactación y expansión mecánicas, o almacenamiento, una composición química orgánica biológicamente compatible adicional se combina de forma no covalente con el material funcionalizado y la entidad inmovilizada.

Los materiales de sustrato pueden tener también una multiplicidad de grupos químicos reactivos añadidos a las superficies de los materiales a través de la aplicación de una o más composiciones o materiales de recubrimiento, a las superficies. Al menos una porción de un material de recubrimiento tiene elementos, grupos, compuestos o componentes químicos que son reactivos para las entidades biológicamente activas y sirven para unir, confinar, o inmovilizar de otra manera una entidad biológicamente activa en una forma biológicamente activa con el material de recubrimiento. El material de recubrimiento se puede aplicar en la forma de un soluto, partícula, dispersión, recubrimiento, o superposición y se puede unir al material de sustrato en una variedad de maneras, que incluyen, pero no se limitan a, unión covalente, adsorción, tal como, fisisorción o quimisorción, y unión no covalente, tal como enlace de hidrógeno o enlace iónico. En realizaciones preferidas, el material de recubrimiento se aplica en una solución y forma una capa de película continua o discontinua en una o más superficies del material de sustrato después de la separación del disolvente. El material de recubrimiento se puede aplicar en una o más capas. Los constituyentes químicos del material de recubrimiento en cada capa pueden ser los mismos o diferentes. En algunas realizaciones, el material de recubrimiento se retícula en sí mismo o con otros materiales de recubrimiento en otras capas. Los enlaces de reticulación pueden ser covalentes o iónicos.

Los materiales de sustrato (12, 14) que carecen de grupos químicos reactivos en sus superficies (Figura 1A) (o que carecen apropiadamente de grupos químicos reactivos) se recubren, al menos en parte, con un material de recubrimiento polimérico (18) que tiene una multiplicidad de grupos químicos reactivos (16) sobre el mismo (figuras 3 y 3A) a los que las entidades biológicamente activas (17) se pueden unir, confinar, o inmovilizar de otra manera (figuras 4 y 4A). La mayor parte de las entidades biológicamente activas (17) se unen o se enlazan covalentemente, al material de recubrimiento polimérico (18) a través de los grupos químicos reactivos (16) del material de recubrimiento (18). El material de recubrimiento polimérico (18) forma al menos una capa sobre al menos una porción de un material de sustrato (12, 14). En algunas realizaciones, el material de recubrimiento polimérico (18) se retícula (19) en sí mismo o con otras capas (18a, 18b) de material de recubrimiento polimérico (Figura 7 y 7a). La reticulación puede ser covalente, iónica, o ambas. Los materiales de sustrato susceptibles de ser recubiertos son vidrio, metales (14), cerámicas, materiales poliméricos (12), particularmente materiales poliméricos químicamente inertes, tales como politetrafluoroetileno.

Al menos un tipo de entidad biológicamente activa que es un oligosacárido o polisacárido con capacidad de unión a la anti-trombina III (17) se une químicamente, se confina, o se inmoviliza de otro modo a grupos químicos reactivos adecuados (16) sobre el material de sustrato (12, 14) y/o el material de recubrimiento (18).

Las composiciones biológicamente compatibles (11, 15, 100) incluyen, pero no se limitan a, antitrombóticos, anticoagulantes, agentes fibrinolíticos o trombolíticos, antibióticos, compuestos antimicrobianos/antisépticos, compuestos anti-virales, antiproliferativos, compuestos de adhesión celular, compuestos antiadhesivos celulares, y antiinflamatorios. Los antitrombóticos de particular interés son los glucosaminoglucanos, en particular la heparina, incluyendo derivados y análogos de la misma. Otros agentes anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, hirudina, proteína C activada, y prostaglandinas. Los agentes fibrinolíticos o trombolíticos incluyen, pero no se limitan a, estreptocinasa, urocinasa, y activador del plasminógeno tisular (tPA). Los ejemplos de antibióticos incluyen, pero no se limitan a, penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, minociclina, doxiciclina, vancomicina, bacitracina, kanamicina, neomicina, gentamicina, eritromicina y cefalosporinas. Los ejemplos de cefalosporinas incluyen cefalotina, cefapirina, cefazolina, cefalexina, cefradina, cefadroxil, cefamandol, cefoxitina, cefaclor, cefuroxima, cefonicida, ceforanida, cefotaxima, moxalactam, ceftrozoxima, ceftriaxona, y cefoperazona. Los ejemplos de antimicrobianos/antisépticos incluyen, pero no se limitan a, sulfadiazina de plata, clorhexidina, ácido peracético, hipoclorito de sodio, triclosán, fenoles, compuestos fenólicos, compuestos yodóforos, compuestos de amonio cuaternario, compuestos de cloro, heparina y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de agentes anti-virales incluyen, pero no se limitan a, alfa-metil-1-adamantanometilamina, hidroxietoximetilguanina, adamantanamina, 5-yodo-2'-desoxiuridina, trifluorotimidina, interferón, y adenina-arabinósido. Los compuestos de adhesión celular incluyen, pero no se limitan a, fibronectina, laminina, colágeno, vitronectina, osteopontina, péptidos RGD, péptidos RGDS, péptidos YIGSR, y anticuerpos dirigidos a antígenos de superficie celular. Los compuestos que pueden resistir la unión celular incluyen poli HEMA, polietilenglicol, polisacáridos, polivinilpirrolidona, y fosfolípidos. Otras entidades biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, enzimas, catalizadores orgánicos, ribozimas,

organometálicos, proteínas, glucoproteínas, péptidos, poliaminoácidos, anticuerpos, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, moléculas esteroideas, antibióticos, compuestos antimicrobianos, antimicóticos, citocinas, hidratos de carbono, oleofóbicos, lípidos, productos farmacéuticos y terapéuticos.

5 Las entidades biológicamente activas (17) de uso más preferidas en la presente invención, como se ha descrito antes, son los oligosacáridos o polisacáridos capaces de interactuar con componentes de la sangre de mamífero para evitar la coagulación o formación de trombos sobre las superficies de un material de sustrato (12, 14) o material de recubrimiento (18) por los componentes de la sangre. Algunos de los polisacáridos son glucosaminoglucanos incluidas las composiciones de glucosamina o galactosamina. Los glucosaminoglucanos preferidos son
10 composiciones de heparina, análogos de heparina, y derivados de heparina. La heparina es un glucosaminoglucano complejo con muchas funciones biológicas mediadas por su unión a factores de crecimiento, enzimas, morfógenos, moléculas de adhesión celular, y citocinas. La actividad biológica de la heparina para funcionar como un anticoagulante se basa en la capacidad de la heparina para actuar como un catalizador para la unión a la trombina y anti-trombina III (AT III). La mayor parte de la actividad anti-coagulante de la heparina se asocia con una secuencia de pentasacárido que facilita esta unión.

15 La composición de heparina más preferida para la inmovilización en la presente invención es una composición de heparina que tiene un grupo aldehído terminal libre preparada según las instrucciones de la patente de Estados Unidos. No. 4.613.665, expedida a Larm. En el procedimiento de preparación de heparina con un grupo aldehído terminal libre, la heparina se somete a degradación por diazoación para formar un fragmento de heparina que tiene un grupo aldehído terminal libre. El grupo aldehído terminal libre permite que la composición de heparina esté “unida
20 en el punto extremo” a los grupos amino primarios de un sustrato o material de recubrimiento polimérico para formar una imina que, por reducción, se convierte en una amina secundaria. La unión en el punto extremo de la composición de heparina permite que la heparina sea inmovilizada en una conformación que expone muy ventajosamente la porción biológicamente activa de la composición de heparina a los componentes de la sangre responsables de la coagulación y formación de trombos. Cuando se expone a los componentes de la sangre
25 responsables de la formación de trombos y de la coagulación, la heparina inmovilizada de manera óptima interactúa con los componentes de la sangre para reducir o prevenir la formación de trombos o otros episodios de coagulación sobre las superficies del material de sustrato y/o de recubrimiento.

Otras entidades biológicamente activas deseables (17) para su uso en la presente invención incluyen composiciones de heparina sintética que se denominan “fondaparinux,” composiciones que implican la inhibición mediada por la
30 antitrombina III del factor Xa, antiproliferativas y antiinflamatorias.

A pesar de un esquema de inmovilización optimizado, la actividad biológica de una entidad biológica basada en heparina se redujo significativamente durante la esterilización, compactación y expansión mecánicas, y/o el almacenamiento de las entidades (figuras 9, 11, 12, y 13). Como se ha expuesto anteriormente, la reducción de la actividad biológica de una entidad biológicamente activa inmovilizada puede ser causada por una variedad de
35 factores.

Independientemente del mecanismo por el cual disminuye la actividad biológica de una entidad inmovilizada, la adición de una composición orgánica biológicamente compatible combinada de manera no covalente con la entidad biológicamente activa inmovilizada mantiene la actividad biológica de la entidad durante y después de la esterilización, manipulación mecánica – tal como compactación y expansión mecánicas, y/o almacenamiento de las
40 entidades.

La composición orgánica biológicamente compatible adicional puede tener alguna actividad biológica o ninguna actividad biológica. La composición orgánica biológicamente compatible adicional es un polisacárido que es un glucosaminoglucano, dextrano o sulfato de dextrano. Se describen también composiciones orgánicas biológicamente compatibles que incluyen mucopolisacáridos ácidos, aminoácidos, polipéptidos, proteínas, glucoproteínas, nucleósidos, nucleótidos, polinucleótidos, u otro compuesto alifático o aromático biológicamente compatible, cargado o no cargado, que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 100.000.
45

Con referencia a las figuras 5-6A, los materiales de sustrato recubierto o no recubierto (14, 12, respectivamente) que tienen entidades biológicamente activas (17) inmovilizadas sobre ellos tienen una composición biológicamente compatible adicional (100) combinada con las entidades biológicamente activas (17), el material de sustrato (12, 14)
50 y/o el material de recubrimiento (18). La composición biológicamente compatible es orgánica. La composición orgánica biológicamente compatible se puede aplicar a las entidades biológicamente activas inmovilizadas, al sustrato, y/o al material de recubrimiento en una variedad de maneras. En una realización preferida, una composición biológicamente compatible adecuada basada en hidratos de carbono se disuelve en un disolvente acuoso y la solución se aplica a las entidades biológicamente activas inmovilizadas, al sustrato, y/o al material de recubrimiento polimérico mediante pulverización, recubrimiento por inmersión, inmersión, rodillo, extensión, u otros
55 medios de deposición. En sistemas apropiados, las composiciones biológicamente compatibles se pueden disolver en disolventes orgánicos y se aplican de manera similar.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a un dispositivo médico esterilizado para implantación, u otra colocación, en un sitio anatómico. También son preferidos los dispositivos médicos esterilizados para

colocación dentro de una estructura anatómica que delimita un espacio vacío, o lumen, para reforzar la estructura anatómica o mantener el espacio vacío delimitado de este modo. Cuando se utilizan estos dispositivos esterilizados dentro de una estructura vascular, las entidades biológicamente activas inmovilizadas en la forma de heparina unida en el punto extremo, interactúan con la sangre que fluye a través de, o alrededor de los dispositivos. para reducir al
 5 mínimo o prevenir la formación de trombos u otros productos de coagulación sobre las superficies de los dispositivos que están en contacto con la sangre. En un aspecto de la descripción, la composición orgánica biológicamente compatible adicional es un compuesto de polietilenglicol combinado covalentemente con el material de sustrato y/o material de recubrimiento. La heparina unida covalentemente puede permanecer con los dispositivos esterilizados. El método de esterilización preferido incluye óxido de etileno gas.

10 La fabricación de dispositivos médicos puede requerir manipulación mecánica que a menudo reduce la actividad biológica de una entidad biológicamente activa inmovilizada. La composición biológicamente compatible adicional combinada con las entidades biológicamente activas inmovilizadas, el material de sustrato, y/o el material de recubrimiento, como se ha descrito antes, puede mantener también la actividad biológica de las entidades biológicamente activas inmovilizadas después de la compactación y expansión mecánicas de un dispositivo médico
 15 (figuras. 12 y 13). Los stents expandibles y los stents-injertos son dispositivos médicos para los que la actividad biológica mejorada de las entidades biológicamente activas inmovilizadas es particularmente significativa.

La presente invención, por lo tanto, proporciona dispositivos esterilizados que tienen entidades biológicamente activas inmovilizadas en los mismos, donde la actividad biológica de las entidades inmovilizadas se mantiene significativamente durante y después de un procedimiento de esterilización (figuras. 9-11, y 13). Antes de la
 20 esterilización, los dispositivos pueden ser manipulados mecánicamente, a través de compactación y expansión, por ejemplo, y mantienen una actividad biológica significativa (figuras. 12 y 13).

La Figura 14 ilustra esquemáticamente realizaciones de la presente invención (50) que tienen un sustrato polimérico (12) que tiene un material de revestimiento o recubrimiento polimérico (18) reticulado (19) sobre el mismo. El recubrimiento (18) tiene una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas "B" (17) unidas al mismo.
 25 El recubrimiento (18) tiene también una pluralidad de grupos químicamente reactivos "R" (13) sobre el mismo a los cuales puede ser unida covalentemente una composición biológicamente compatible "S" (15) (figuras 16 y 17). En algunas realizaciones, los enlaces covalentes son reversibles, haciendo de este modo que la composición biológicamente compatible "S" (15) sea liberable de la invención en condiciones apropiadas. Las figuras 15 y 17 ilustran esquemáticamente construcciones (50) similares utilizando un sustrato metálico (14).

30 Las figuras 18 y 19 ilustran esquemáticamente realizaciones de la presente invención (70) que tienen un sustrato polimérico (12) o un sustrato metálico (14) que tienen un material de revestimiento o recubrimiento polimérico (18) reticulado (19) sobre el mismo. El recubrimiento (18) tiene una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas "B" (17) y una primera composición biológicamente compatible "S" (15) unidas covalentemente al mismo. En algunas realizaciones, los enlaces covalentes son reversibles, haciendo de este modo que la
 35 composición biológicamente compatible "S" (15) sea liberable de la invención en condiciones apropiadas. En adición, esta realización tiene una segunda composición biológicamente compatible "A" (11) mezclada con ellas.

Las figuras 20 y 21 ilustran esquemáticamente realizaciones de la presente invención (80) que tienen un sustrato polimérico (12) o un sustrato metálico (14) que tienen un material de revestimiento o recubrimiento polimérico (18) reticulado (19) sobre el mismo. El recubrimiento (18) tiene una pluralidad de entidades biológicamente activas "B"
 40 (17) inmovilizadas en el mismo. Una primera composición biológicamente compatible (100) se combina con las entidades biológicamente activas (17). En adición, esta realización tiene una segunda composición biológicamente compatible "A" (11) mezclada con ellas.

Ejemplos

45 Excepto para el Ejemplo 1, los cálculos de la actividad de la heparina sobre las superficies en la presente invención se realizaron utilizando el área de superficie de un solo lado del material de muestra, aunque la muestra entera, incluyendo los intersticios, puede tener heparina inmovilizada sobre ella. La actividad de heparina se ensayó midiendo la aptitud, o capacidad, de la heparina unida en el punto extremo, para unirse a una cantidad conocida de anti-trombina III (ATIII). Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III (ATIII) unidos por centímetro cuadrado de material de sustrato (pmol de ATIII/cm² de material de sustrato). Este ensayo está descrito
 50 por Larsen M.L., *et. al.*, en "Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA" (S-2238) (Thromb. Res. 1978; 13:285-288) y Pasche, *et. al.*, en "A binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" (Artif. Organs 1991; 15:281-491).

La actividad de unión a ATIII por área de superficie de material de sustrato se define como el número de picomoles de ATIII unidos por el área de superficie aparente del material de sustrato recubierto o no recubierto. El área de
 55 superficie aparente del sustrato no tiene en cuenta múltiples superficies recubiertas ni consideraciones de porosidad de un material de sustrato poroso. Si el material de sustrato es poroso, el efecto de la porosidad sobre el área de superficie no se considera para estos cálculos. Por ejemplo, el área de superficie aparente de un injerto vascular de ePTFE tubular cilíndrico (que está hecho de un material poroso) con heparina unida en el punto extremo, inmovilizada sobre el material de sustrato que comprende la superficie interior del injerto tubular, se calcula tal como

para cualquier geometría cilíndrica como $2\pi rL$: donde r es el radio interior del injerto; L es la longitud axial; y π es el número pi. Es importante señalar que la naturaleza porosa de ePTFE y su efecto sobre el área de superficie no se tienen en cuenta aquí. Por consiguiente, los materiales de sustrato no porosos que se cortan en cuadrados para el análisis, se considera que tienen un área de superficie de la longitud multiplicada por la anchura.

5 Los ejemplos marcados con un asterisco (*) son ejemplos de referencia y no forman parte de la presente invención.

Ejemplo 1*

Este ejemplo demuestra la retención de la actividad biológica de heparina no unida "neta" después de exposición de la heparina a un procedimiento de esterilización con óxido de etileno (ETO).

10 En este ejemplo, se obtuvo heparina sódica grado USP sin esterilizar, en forma de polvo liofilizado de Celsus Laboratories (Cincinnati, OH). Cantidades medidas de heparina se colocaron en bolsas de esterilización CHEX-ALL® (Long Island City, NY) para análisis. Un grupo de bolsas que contenían heparina se expuso a esterilización con ETO. La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de, acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h). Se sometió otro grupo al procedimiento de esterilización en ausencia de ETO. Un tercer grupo no se expuso al procedimiento de esterilización.

15 Después del procedimiento de esterilización, se retiraron cantidades conocidas de heparina de cada bolsa y se ensayaron en cuanto a bio-actividad con un kit de ensayo de heparina ACTICHROME (anti-FXa) disponible de American Diagnostica Inc. (Stamford, CT.). Los valores de bioactividad para cada muestra de heparina se expresaron como unidades internacionales de heparina por masa de heparina (IU/mg). Las unidades internacionales de heparina se calculan en base a la inactivación de Factor X_a por ATIII que es catalizada por la heparina. Las unidades internacionales son por lo tanto una medida de la actividad de unión a la ATIII de la heparina. Cualquier reducción en la actividad de la heparina se expresa simplemente como una reducción en las IU/mg de los controles de heparina comparables del ensayo con ACTICHROME. La heparina que presenta una reducción en la actividad se considera que ha sido desactivada hasta un nivel por el procedimiento de esterilización.

20 La Figura 8 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de la esterilización con ETO sobre la actividad de unión a la anti-trombina III (ATIII) de la heparina seca, en polvo, en estado no unida. La Figura 8 muestra los niveles medios de actividad, expresada como IU/mg, para las muestras de heparina (n = 3) de cada grupo. Las muestras de heparina control que no se sometieron a esterilización tenían un valor medio de 138 IU/mg. Las muestras de heparina control que sufrieron el procedimiento de esterilización en ausencia de ETO (es decir, alta humedad, altas temperaturas, etc.) tuvieron un valor medio de 119 IU/mg. Las muestras de heparina que sufrieron el procedimiento de esterilización en presencia de ETO tuvieron un valor medio de 123 IU/mg. Las muestras de heparina expuestas al procedimiento de esterilización en ausencia de ETO tuvieron una disminución de la actividad de un catorce por ciento (14 %) en comparación con las muestras de control no esterilizadas, mientras que las muestras expuestas al procedimiento de esterilización en presencia de ETO tuvieron solamente un once por ciento (11 %) de disminución de la actividad. Como se ve en la Figura 8, la esterilización de heparina polvo, no unida, neta, en presencia o ausencia de ETO no reduce significativamente la unión de ATIII a la heparina cuando se compara con las muestras de control no esterilizadas. La actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina no unida, no esterilizada, no se reduce de manera significativa por la esterilización sin ETO ni por la esterilización con ETO. Por lo tanto, la degradación de la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada sometida a condiciones similares de esterilización con ETO debe ser causada por un mecanismo distinto de la simple exposición a la esterilización con o sin ETO.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe la construcción de una realización de la presente invención en la que la unión de la heparina a la antitrombina III (ATIII) no se reduce significativamente por la exposición a esterilización con ETO.

45 De acuerdo con la patente de Estados Unidos No. 6.653.457, una composición de heparina modificada con aldehído preparada según la patente de Estados Unidos No. 4.613.665, se unió en el punto extremo a un material de recubrimiento, o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). Una composición orgánica biológicamente compatible adicional se incorporó dentro del material de recubrimiento y la heparina unida, para hacer posible que la heparina inmovilizada sufra la esterilización con ETO sin pérdida significativa de actividad biológica.

50 Se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406). Un material de recubrimiento en forma de un recubrimiento base se aplicó al material de ePTFE montando el material sobre un aro de bordar de plástico de diez centímetros (10 cm) de diámetro y sumergiendo el material soportado en ePTFE primero en alcohol isopropílico (IPA) al 100 % durante aproximadamente cinco minutos (5 min) y después en una solución de polietileno-imina (PEI) LUPASOL®, y IPA en una relación uno a uno (1:1). La PEI LUPASOL® libre de agua se obtuvo de BASF y se diluyó hasta una concentración de aproximadamente cuatro por ciento (4 %) y se ajustó a pH 9,6. Después de la inmersión del material de ePTFE en la solución durante aproximadamente quince minutos (15 min), se retiró el material de la

solución y se enjuagó con agua desionizada (DI) a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). La PEI que queda sobre el material de ePTFE se reticuló con una solución acuosa al 0,05 % de glutaraldehído (obtenido de Amresco) a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Se añadió PEI adicional a la construcción colocando la construcción en una solución acuosa al 0,5 % de PEI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min) y enjuagando de nuevo en agua DI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). La imina formada como resultado de la reacción entre el glutaraldehído y la capa de PEI se reduce con una solución de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3) (5 g disuelto en 1 L de agua DI, pH 9,6) durante quince minutos (15 min) y se enjuaga con agua DI durante treinta minutos (30 min).

Se añadió una capa adicional de PEI a la construcción sumergiendo la construcción en solución acuosa de glutaraldehído al 0,05 % a pH 9,6 durante quince minutos (15 min), seguido por inmersión en una solución acuosa al 0,5 % de PEI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Después, se enjuagó la construcción con agua DI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Las iminas resultantes se redujeron sumergiendo la construcción en una solución de NaCNBH_3 (5 g disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,6) durante quince minutos (15 min), seguido por un enjuagado en agua DI durante treinta minutos (30 min). Se aplicó una tercera capa a la construcción mediante la repetición de estas etapas. El resultado fue un material de base fluoropolimérico hidrófobo poroso que tiene una cubierta base de polímero reticulado hidrófilo sobre sustancialmente todas las superficies expuestas e intersticiales del material base.

Se unió una capa química intermedia a la cubierta base polimérica en preparación para la colocación de otra capa de PEI sobre la construcción. La capa de carga iónica intermedia se preparó por incubación de la construcción en una solución de sulfato de dextrano (Amersham Pharmacia Biotech) y cloruro de sodio (0,15 g de sulfato de dextrano y 100 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3) a 60 °C durante noventa minutos (90 min), seguido por enjuagado con agua DI durante quince minutos (15 min).

Una capa de PEI, denominada en esta memoria como una “capa de tapado”, se unió a la capa intermedia mediante la colocación de la construcción en una solución acuosa al 0,3 % de PEI (pH 9) durante aproximadamente cuarenta y cinco minutos (45 min), seguido por un enjuagado en una solución de cloruro de sodio (50 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI) durante veinte minutos (20 min). Se realizó un enjuagado final con agua DI durante veinte minutos (20 min).

La heparina modificada con aldehído se unió o se conjugó en el punto extremo, a la capa o capas de PEI mediante la colocación de la construcción en una solución de sal de cloruro de sodio que contenía heparina (1,5 g de heparina, 29,3 g de NaCl disuelto en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 2,86 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH_3 a un litro (1 L) de solución de heparina antes de añadir las muestras. Se enjuagaron entonces las muestras con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min), seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE. La presencia y uniformidad de la heparina se determinó tiñendo las muestras de la construcción por ambos lados con azul de toluidina. La tinción produjo una superficie teñida uniformemente de color púrpura, lo que indica que la heparina estaba presente y unida uniformemente al material de ePTFE.

Mediante la adición de compuestos o composiciones particulares a la construcción unida a heparina, la actividad biológica de la heparina se puede mantener después de la exposición a condiciones que de otra manera pueden reducir la actividad biológica de la heparina. Las condiciones incluyen, pero no se limitan a, esterilización con ETO, compactación y expansión mecánicas y almacenamiento.

Las construcciones descritas anteriormente recubiertas con un material de recubrimiento se expusieron a soluciones de los siguientes compuestos para evaluar su efecto estabilizador sobre la actividad biológica de la heparina unida a partes del recubrimiento: cloruro de calcio grado USP (Fisher Scientific), heparina sódica grado USP (Celsus), polietilenglicol (peso molecular 20.000, Sigma), dextrano DEAE (peso molecular 500.000, PK química), sal de sodio de sulfato de dextrano (peso molecular 8.000, Sigma), y dextrano (peso molecular 9.500, Sigma) a concentraciones de 0,5 g por 100 mL de agua DI ajustada a pH 9,6. Se utilizó también dexametasona a 0,5 g por 100 mL de etanol sin ajuste de pH. Cada una de estas soluciones se denomina en la presente memoria una “solución de tratamiento”. El efecto de estos diferentes compuestos sobre la actividad de unión de la heparina a la antitrombina III (ATIII) después de esterilización con ETO se expresó como picomoles de anti-trombina III unidos por centímetro cuadrado (cm^2) de material de sustrato. Estos datos se resumen en la Figura 9.

Para exponer una construcción particular que contiene heparina a una solución particular de tratamiento, se colocó la construcción en un vaso de precipitados de dos litros (2 L) y se añadieron cien mililitros (100 mL) de solución de tratamiento, suficiente para sumergir completamente la construcción en la solución de tratamiento. Cada construcción se expuso a la solución de tratamiento durante una hora (1 h) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se retiró la construcción de la solución y se liofilizó antes de la exposición a un procedimiento de esterilización.

En la preparación para esterilización con ETO, cada construcción liofilizada se colocó y se selló en una bolsa de autosellado de una torre DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL.). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia del ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un

tiempo de aireación de doce horas (12 h).

Después de la esterilización con ETO, cada construcción (incluidos los controles) se retiró de su bolsa y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min).

Se cortaron muestras de la construcción de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) de tamaño y se ensayaron en cuanto a actividad de heparina midiendo la capacidad de la heparina unida en el punto extremo, para unirse a ATIII. El ensayo está descrito por Larsen M.L., *et. al.*, en "Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238)." *Thromb. Res.* 13:285-288 (1978) y Pasche B, *et. al.*, en "A binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" *Artif. Organs* 15:281-491 (1991). Los resultados se expresaron como la cantidad de ATIII unida por unidad de área superficial de material de sustrato en picomoles por centímetro cuadrado (pmol/cm^2). Todas las muestras se mantuvieron en condiciones húmedas durante todo el ensayo. Es importante señalar que, aunque las muestras de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) tienen cada una un área de superficie total de dos centímetros cuadrados (2 cm^2) si se consideran ambos lados del material, se utilizó solamente una superficie de la muestra (esto es, 1 cm^2) para calcular la actividad de unión de la heparina a ATIII en pmol/cm^2 .

La Figura 9 es un gráfico de barras que ilustra los efectos de diversas composiciones orgánicas biológicamente compatibles, combinadas en forma no covalente con heparina inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto, sobre la actividad de unión de la heparina inmovilizada a la anti-trombina III después de la exposición de la heparina inmovilizada a esterilización con ETO.

La actividad de unión de la anti-trombina III a la heparina inmovilizada se expresó en picomoles de ATIII unida por centímetro cuadrado de material de sustrato (pmol/cm^2). Un conjunto de muestras de control no fueron esterilizadas. Otro conjunto de muestras de control se sometieron a esterilización con ETO en ausencia de una composición orgánica biológicamente compatible combinada de forma no covalente con la heparina inmovilizada y el material de recubrimiento. Cada barra restante representa la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada en presencia de la composición orgánica biológicamente compatible indicada combinada de forma no covalente con la heparina inmovilizada y el material de recubrimiento. Todas las barras representan valores medios de $n = 3$ muestras, excepto para el sulfato de dextrano con $n = 6$ muestras.

Como se puede ver en el gráfico de barras, las muestras de control esterilizadas mostraron una reducción importante en la actividad de unión a la anti-trombina III en comparación con las muestras de control no esterilizadas. La actividad de unión a la anti-trombina III de las muestras de control no esterilizadas fue de $103 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato. La actividad de unión a la anti-trombina III de las muestras de control esterilizadas fue de $66 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato. La esterilización con ETO causó una reducción del treinta y seis por ciento (36 %) en la actividad de unión a la anti-trombina III en comparación con las muestras no esterilizadas.

La influencia de las composiciones orgánicas biológicamente compatibles descritas anteriormente combinadas de forma no covalente con la heparina inmovilizada y el material de recubrimiento, sobre la actividad de unión a la anti-trombina III se resume en el siguiente párrafo. Cada composición orgánica biológicamente compatible se enjuagó, como se ha descrito antes, de cada construcción antes de que fuera determinada la actividad de unión a la anti-trombina III.

Cuando se añadió heparina a la construcción, la actividad media de unión a la anti-trombina III fue de $108 \text{ pmol}/\text{cm}^2$. La adición de dextrano a la construcción dio como resultado una actividad media de unión a la anti-trombina III de $98 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato. Cuando se añadió sulfato de dextrano a la construcción, la actividad media de unión a la anti-trombina III fue de $134 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato. Adicionalmente, el polietilenglicol dio como resultado una actividad media de unión a la anti-trombina III de $129 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato. De manera interesante, estos valores son mayores que los valores medios de las muestras de control no esterilizadas de $103 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato.

Cuando se añadió cloruro de calcio inorgánico (CaCl_2) a la construcción, la actividad media de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada fue de $75 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato. La adición de dexametasona a la construcción dio como resultado una actividad media de unión a la anti-trombina III de $42 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato. El dextrano DEAE pareció disminuir la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada con una actividad media de $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato.

Estos resultados demuestran la capacidad de los dispositivos de la presente invención, en los que la composición orgánica biológicamente compatible es heparina, dextrano o sulfato de dextrano, para mantener o aumentar, la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina unida en el punto extremo, después de esterilización con ETO con una composición biológicamente compatible apropiada combinada de forma no covalente con la heparina inmovilizada y el material de recubrimiento.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la capacidad de una composición orgánica biológicamente compatible adicional para producir una alta actividad de unión a la anti-trombina III (ATIII) de la heparina unida en el punto extremo a un material de recubrimiento polimérico sobre un material de sustrato que es un componente de un dispositivo médico implantable.

5 El dispositivo médico implantable utilizado en este ejemplo tenía la forma de tubo reforzado con un alambre de nitinol hecho de un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), poroso, obtenido de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. con el nombre comercial Endoprótesis VIABAHN®. El dispositivo tubular tenía quince centímetros (15 cm) de longitud y seis milímetros (6 mm) de diámetro.

10 La endoprótesis VIABAHN® estaba constreñida dentro de un catéter de administración y requería la retirada del catéter antes de la inmovilización de la heparina sobre la misma. Cada dispositivo constreñido en un catéter se sacó para el procesamiento tirando de una cuerda de liberación unida a una vaina de constricción y liberando la vaina de alrededor del dispositivo. Una vez libre, cada dispositivo se expandió y se utilizó como un material de sustrato separado. Cada material de sustrato (dispositivo de endoprótesis) se sumergió en una solución de PEI (al 5 % en agua DI) y de IPA (grado USP) en una relación de volumen en tanto por ciento de 30:70, respectivamente, durante 15 aproximadamente doce horas (12 h) para colocar un material de recubrimiento polimérico (18) sobre el material de sustrato (12). El material de recubrimiento polimérico (18) tenía una multiplicidad de grupos químicos reactivos (16) a los cuales se unieron eventualmente en el punto extremo, una pluralidad de moléculas de heparina modificadas con aldehído (17).

20 Al menos una capa adicional de material de recubrimiento (18a, 18b) se colocó sobre la primera capa de PEI (18). Esto se realizó colocando cada dispositivo endoprotésico dentro de un tubo de silicona separado y conectando el tubo a una bomba peristáltica y depósito de solución. Esto permitió que una solución adicional que contenía un material de recubrimiento pasara repetidamente a través del centro del dispositivo médico tubular para recubrir principalmente las superficies interiores del dispositivo.

25 Con cada endoprótesis constreñida dentro de uno de estos sistemas de flujo dinámico, se pasó a través del dispositivo un material de recubrimiento (18) en la forma de una solución acuosa al 0,10 % (pH 9,0) de PEI e IPA en una relación de volumen en tanto por ciento de 45:55, respectivamente, durante aproximadamente veinte minutos (20 min). Después, se enjuagó cada dispositivo con agua DI (pH 9,0) durante cinco minutos (5 min) y las capas de PEI se reticularon (19) por exposición a una solución acuosa de glutaraldehído al 0,05 % (pH 9,0) durante veinte minutos (20 min). Los dispositivos se enjuagaron entonces de nuevo con una solución acuosa de PEI (al 0,10 %, pH 30 9,0) durante cinco minutos (5 min). Las iminas resultantes se redujeron con una solución de cianoborohidruro de sodio (5 g en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante quince minutos (15 min) y se enjuagaron con agua DI durante treinta minutos (30 min).

35 Se colocó una capa de carga iónica intermedia sobre la capa o capas de PEI reticuladas de cada dispositivo haciendo fluir una solución de sulfato de dextrano (0,15 g de sulfato de dextrano y cien gramos de cloruro de sodio (100 g de NaCl) disueltos en un litro (1 L) de agua DI, pH 3) a través del sistema de flujo dinámico y sobre la capa de PEI a sesenta grados centígrados (60 °C) durante aproximadamente noventa minutos (90 min). Esto fue seguido por enjuagado del sistema con agua DI durante quince minutos (15 min).

40 Se añadió una capa de "tapado" (18b) de PEI a la capa de sulfato de dextrano cargada iónicamente (18a) haciendo fluir una solución acuosa de PEI (al 0,075 %, pH 9,0) a través del sistema de flujo dinámico durante aproximadamente cuarenta y cinco minutos (45 min), seguido por un enjuagado con una solución de cloruro de sodio (50 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI) durante quince minutos (15 min). El enjuagado fue seguido por una breve descarga de agua DI durante aproximadamente dos minutos y medio (2,5 min).

45 La heparina modificada con aldehído se unió o se conjugó en el punto extremo, a la capa o capas de PEI mediante la colocación de la construcción en una solución de sal de cloruro de sodio que contenía heparina (1,5 g de heparina, 29,3 g de NaCl disueltos en agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 2,86 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ a un litro (1 L) de solución de heparina, diez minutos (10 min) después de iniciar la etapa. Un primer enjuagado con agua DI durante quince minutos (15 min), fue seguido por un enjuagado con una solución de ácido bórico (0,7 g de NaCl, 10,6 g de ácido bórico y 2,7 g de NaOH disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante aproximadamente veinte minutos (20 min), y un enjuagado final con agua DI durante quince minutos (15 min). Después, se sometió la construcción a un proceso de liofilización. La tinción de muestras seleccionadas con azul de toluidina produjo una superficie de color púrpura consistente que indica heparina unida uniformemente.

55 Basándose en los resultados obtenidos en los estudios descritos en el Ejemplo 2, *supra*, se seleccionaron heparina grado USP (sal de sodio) y sulfato de dextrano de peso molecular 8.000 (sal de sodio) a una concentración de 0,5 g/100 mL de agua DI (pH 9,6), como las composiciones orgánicas biológicamente compatibles preferidas para mantener, o estabilizar, la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada durante y después de esterilización con ETO.

Para cada composición orgánica biológicamente compatible preferida, las secciones de las endoprótesis que tienen

heparina unida en el punto extremo a un material de recubrimiento polimérico, se colocaron en tubos de plástico que contenían una solución de dichas composiciones orgánicas biológicamente compatibles (cada una a una concentración de 0,5 g/100 mL de agua DI, pH 9,6) y se incubaron a sesenta grados centígrados (60 °C) durante una hora (1 h). Cada muestra tratada se retiró del tubo de plástico y se expuso a un proceso de liofilización.

5 Cada muestra liofilizada se colocó en una bolsa de autosellado de una torre DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL.) y se selló para esterilización con ETO. La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

10 Después de esterilización con ETO, cada construcción se retiró de su bolsa y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min).

15 Se cortaron de cada dispositivo muestras de material de sustrato de cada dispositivo esterilizado con ETO (aproximadamente 0,5 cm de largo) y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad biológica utilizando el ensayo descrito anteriormente de unión a ATIII (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron húmedas a lo largo del procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unidos por unidad de área del material de sustrato (pmol/cm^2), medidos sobre la superficie luminal de cada dispositivo y no en toda el área superficial del dispositivo (esto es, ambas superficies abluminal y luminal).

20 La Figura 10 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de dos composiciones orgánicas biológicamente compatibles separadas en la forma de heparina y sulfato de dextrano sobre la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto durante y después de la exposición a un régimen de esterilización con ETO. La actividad de unión a la anti-trombina III se expresa como picomoles de anti-trombina III unida por centímetro cuadrado de material de sustrato. Como se ve por los resultados, el uso de composiciones orgánicas biológicamente compatibles de heparina y sulfato de dextrano dieron como resultado una alta actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada después de la esterilización con ETO, con actividades de 97 pmol/cm^2 de material de sustrato y 91 pmol/cm^2 de material de sustrato, respectivamente. Todas las barras representan valores medios de $n = 6$ muestras.

Ejemplo 4

30 Este ejemplo describe la construcción de una realización de la presente invención que tiene un compuesto de heparina modificada con aldehído unido en el punto extremo a un material de recubrimiento polimérico que incluye una primera capa de recubrimiento iónicamente neutra. La construcción tenía una unión de heparina a ATIII que no había disminuido significativamente por exposición a la esterilización con ETO.

35 El material de recubrimiento utilizado como recubrimiento base en esta construcción se seleccionó para obtener un material de recubrimiento, o recubrimiento con heparina, que no tenía esencialmente ninguna carga iónica. Se utilizaron alcohol polivinílico y PEI como los materiales de recubrimiento.

40 De acuerdo con la patente de Estados Unidos No. 6.653.457, una composición de heparina modificada con aldehído se unió a un material de sustrato recubierto. El material de sustrato (12) era material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). Se incorporó una composición química orgánica biocompatible adicional (100) al material de recubrimiento de la construcción que contiene heparina (18) para permitir que la heparina pueda sufrir una esterilización con ETO sin pérdida significativa de actividad biológica.

45 Se obtuvo un material de sustrato de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406). Se aplicó una capa de material de recubrimiento, o recubrimiento base, al material de sustrato de ePTFE montando el material sobre un aro de bordar de plástico de 10 cm de diámetro y sumergiendo el material soportado en ePTFE en una solución de IPA al 100 % durante aproximadamente cinco minutos (5 min). Esto fue seguido por inmersión del material de ePTFE en una solución acuosa al dos por ciento (2 %) de alcohol polivinílico de grado USP (PVA) (Spectrum) durante quince minutos (15 min). Después de un enjuagado de quince minutos (15 min) en agua DI, la capa de PVA se expuso a una solución acuosa al dos por ciento (2 %) de glutaraldehído y al uno por ciento (1 %) de ácido clorhídrico (HCL) durante quince minutos (15 min) para reticular (19) el PVA (18), *in situ*. Se enjuagó la construcción con agua DI durante quince minutos (15 min), seguido por un segundo enjuagado con agua DI de quince minutos (15 min). El recubrimiento base de PVA reticulado resultante no tenía ninguna carga iónica neta.

55 Se añadió otra capa de material de recubrimiento polimérico (18a) a la construcción mediante la inmersión de la construcción en una solución acuosa al 0,15 % de PEI (pH 10,5) durante treinta minutos (30 min). Las iminas resultantes se redujeron sumergiendo la construcción en una solución acuosa de solución de cianoborohidruro de sodio (5 g/L en agua DI, pH 10,5) durante quince minutos (15 min). Se enjuagó la construcción con agua DI durante quince minutos (15 min), seguido de un segundo enjuagado con agua DI durante quince minutos (15 min).

- Un material de sustrato de ePTFE recubierto que tiene una multiplicidad de grupos químicos reactivos sobre el mismo se sumergió en la solución de heparina (1,0 g de heparina, 29,3 g de NaCl disueltos en agua DI, pH 3,9) durante 90 minutos (90 min) a 60 °C. Se añadió un volumen de 2,86 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ a 1 L de la solución de heparina antes de iniciar esta etapa. Un primer enjuagado de quince minutos (15 min) en agua DI, fue seguido por un enjuagado en una solución acuosa de ácido bórico (0,7 g de NaCl, 10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante aproximadamente veinte minutos (20 min), y un enjuagado final en agua DI durante quince minutos (15 min). Después, se sometió la construcción a un proceso de liofilización. Se tiñeron entonces las muestras de la construcción con azul de toluidina. La tinción produjo una superficie púrpura consistente que indica una heparina unida uniformemente sobre el material de ePTFE recubierto.
- 5
- 10 Se expuso la construcción a una solución acuosa de tratamiento que contiene una composición orgánica biológicamente compatible (100) en la forma de sulfato de dextrano de grado USP de peso molecular 8.000 (sal de sodio) (Sigma) mediante la inmersión de la construcción en 100 mL de solución de tratamiento (0,5 g de sulfato de dextrano/100 mL de agua DI, pH 9,6) a sesenta grados centígrados (60 °C) durante una hora (1 h). Después de la separación de la construcción de la solución de tratamiento, se liofilizó la construcción.
- 15 Cada construcción liofilizada se colocó en una bolsa de autosellado de una torre DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL) para esterilización con ETO. La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).
- 20 Después de esterilización con ETO, cada construcción (incluyendo los controles) se retiró de su bolsa y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con una solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH, 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min).
- 25 Se cortaron muestras de la membrana (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron húmedas a lo largo de todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm² de material de sustrato).
- 30 La Figura 11 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una composición orgánica biológicamente compatible en la forma de sulfato de dextrano sobre la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina unida en el punto extremo inmovilizada sobre un material de sustrato de politetrafluoroetileno expandido poroso y un material de recubrimiento de alcohol polivinílico y PEI, después de esterilización con ETO. La actividad biológica de la heparina inmovilizada se expresó como picomoles de anti-trombina III unida por centímetro cuadrado de material de sustrato.
- 35 Las muestras de control no esterilizadas tenían una actividad de unión a la anti-trombina III de 150 pmol/cm² de material de sustrato. Las muestras de control esterilizadas tenían una actividad de unión a la anti-trombina III de 93 pmol/cm² de material de sustrato. Las muestras esterilizadas con óxido de etileno tratadas con sulfato de dextrano tenían una actividad de unión a la anti-trombina III de 115 pmol/cm² de material de sustrato. Este valor era mayor que los valores de control para los dispositivos esterilizados con ETO que no fueron expuestos a una solución de tratamiento de sulfato de dextrano (esto es, 93 pmol/cm² de material de sustrato), lo que indica que el sulfato de dextrano añadido aumentó la actividad biológica de la heparina inmovilizada después de la esterilización con ETO.
- 40 Ambas de estas construcciones tenían valores de actividad de unión a la anti-trombina III que eran significativamente más bajos que los controles no tratados, ni esterilizados con ETO (150 pmol/cm² de material de sustrato).
- 45 Como se ve por los resultados, el sulfato de dextrano tuvo un impacto significativo sobre la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada unida a una construcción con un material de recubrimiento polimérico que incluye una primera capa de recubrimiento iónicamente neutra, después de la esterilización con ETO. Todas las barras representan valores medios de n = 3 muestras.

Ejemplo 5*

- 50 Este ejemplo describe la capacidad de una composición orgánica biológicamente compatible adicional para mantener o aumentar la actividad biológica de una heparina biológicamente activa inmovilizada en un material de sustrato recubierto durante y después de la imposición de una tensión mecánica de magnitud suficiente para reducir de otro modo de manera significativa la actividad biológica de la entidad.

- 55 En este ejemplo, se aplicó a dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales un recubrimiento que contiene heparina como se describe en el Ejemplo 3, *supra*. Cada prótesis tenía la forma de un tubo reforzado con alambre de nitinol hecho de un material de politetrafluoroetileno expandido, poroso, (ePTFE) obtenido de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. con el nombre comercial de endoprótesis VIABAHN®. El dispositivo tubular tenía quince centímetros (15 cm) de longitud y seis milímetros (6 mm) de diámetro. Se utilizó el mismo procedimiento detallado en el Ejemplo 3 para formar un recubrimiento que contiene heparina sobre el

dispositivo.

5 Para el tratamiento con la composición orgánica biológicamente compatible (100), se preparó el material de sustrato (12) del dispositivo endoluminal con un material de recubrimiento polimérico (18) que tiene heparina modificada con aldehído (17) unida en el punto extremo a al menos una porción del mismo. Secciones del dispositivo preparado se colocaron en tubos de plástico y se incubaron con una solución de glicerol (5 mL, glicerol SigmaUltra de Sigma-Aldrich en 100 mL de agua DI, pH 9,6) a sesenta grados centígrados (60 °C) durante una hora (1 h). Cada dispositivo tratado se retiró del tubo de plástico y se expuso a un proceso de liofilización.

10 Cada endoprótesis cilíndrica fue colocada sobre un sistema de administración intravascular y se comprimió mecánicamente hasta que estuvo suficientemente compactada sobre el sistema de administración para ser constreñida en una funda de constricción. Los dispositivos hechos según el Ejemplo 3 pueden resistir los esfuerzos mecánicos asociados con la compactación de la endoprótesis sobre el sistema de administración sin pérdida significativa de actividad de la heparina incorporada en el recubrimiento.

15 El glicerol fue elegido como la composición orgánica biológicamente compatible unida no covalentemente (100) para mantener la actividad biológica de la heparina unida en el punto extremo (17) durante la compactación y la expansión diametrales de cada endoprótesis de ensayo. Cada sección del dispositivo de endoprótesis de control no tenía la composición de glicerol biológicamente compatible unida no covalentemente (100) incluida con la heparina unida en el punto extremo (es decir, unida covalentemente) (17) y el material de recubrimiento polimérico (18). Cada dispositivo se sometió a un proceso de liofilización.

20 Para comprimir y compactar los dispositivos endoluminales en un sistema de administración, cada endoprótesis fue sacada a través de un embudo cónico con un diámetro fijo. Cada endoprótesis tenía seis (6) puntos de sutura (Gore-Tex® CV-0, 0N05) cosidos a través de un extremo para tirar de los dispositivos a través del embudo. Se tiró de cada dispositivo a través de la apertura de una punta de pipeta de veinticinco mililitros (25 mL) (Falcon®, producto # 357525) con un diámetro de aproximadamente tres milímetros (3 mm) y en un tubo de vidrio con un diámetro de aproximadamente 3,1 mm para mantenerlo en estado compactado.

25 Después de la compactación, cada endoprótesis se desplegó en una solución salina acuosa al 0,9 % a treinta y siete grados centígrados (37 °C), se enjuagó y se ensayó en cuanto a actividad de unión a la anti-trombina III como se describe en la presente memoria. Los resultados se muestran en la Figura 12. Se preparó cada endoprótesis para ensayo por el lavado con agua DI durante quince minutos (15 min), seguido de un enjuagado con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico 2,7 g de NaOH, 0,7 de NaCl, disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min) y un enjuagado final de quince minutos (15 min) con agua DI.

30 Se cortaron muestras de material que contiene heparina de cada endoprótesis (aproximadamente 0,5 cm de largo) y se midió la heparina unida en cuanto a actividad biológica utilizando el ensayo de unión a anti-trombina III (ATIII) descrito antes (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron húmedas durante el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como unión de anti-trombina III por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm^2 de material de sustrato).

35 La Figura 12 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una composición de glicerol con heparina inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto después de la compactación y expansión. Los resultados muestran que la adición de glicerol a la heparina inmovilizada mejora de modo significativo la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina unida, después de la compactación y expansión de la heparina inmovilizada en comparación con muestras de control tratadas de manera similar que no tienen glicerol añadido. Todas las barras verticales representan los valores medios de $n = 3$ muestras.

40 La heparina inmovilizada en un material de recubrimiento polimérico que no recibió la composición orgánica biológicamente compatible de glicerol adicional, y que estaba diametralmente compactada y expandida, mostró una reducción significativa en la actividad de unión a la antitrombina III ($85 \text{ pmol}/\text{cm}^2$) en comparación con los materiales de control construidos y tratados de manera similar no compactados ni expandidos diametralmente ($137 \text{ pmol}/\text{cm}^2$). Cuando los materiales de sustrato recubiertos con heparina inmovilizada se trataron con una composición orgánica de glicerol biológicamente compatible y se expusieron a las mismas manipulaciones mecánicas que la construcción no tratada, la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada se mantuvo similar a la de los materiales de control ($129 \text{ pmol}/\text{cm}^2$).

50 Ejemplo 6

Este ejemplo describe el efecto de la adición de una composición orgánica biológicamente compatible sobre la actividad de unión a ATIII del dispositivo médico recubierto descrito en los Ejemplos 3 y 5, sometido a compactación, expansión y esterilización con ETO.

55 El dispositivo médico implantable utilizado en este ejemplo se construyó de la misma manera que se describe en el Ejemplo 3. El dispositivo tenía la forma de un tubo reforzado con alambre de nitinol hecho de un material de politetrafluoroetileno expandido, poroso, (ePTFE) obtenido de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. con el nombre comercial de endoprótesis VIABAHN®. El dispositivo tubular tenía quince centímetros (15 cm) de longitud y

seis milímetros (6 mm) de diámetro. Se utilizó el mismo procedimiento que se detalla en los Ejemplos 3 para formar un recubrimiento que contiene heparina sobre el dispositivo.

Para tratamiento con la composición orgánica biológicamente compatible (100), se preparó el material de sustrato (12) del dispositivo endoluminal con un material de recubrimiento polimérico (18) que tiene heparina modificada con aldehído (17) unida en el punto extremo a al menos una porción del mismo. El dispositivo preparado se colocó en un tubo de plástico y se incubó con una solución de heparina y glicerol (0,5 g de heparina USP y 5 mL de glicerol disueltos en 100 mL de agua DI, pH 9,6) a sesenta grados centígrados (60 °C) durante una hora (1 h). La elección de estos compuestos se basa en los resultados de los Ejemplos 2, 3 y 5. Cada dispositivo tratado se retiró de la solución de heparina y glicerol y se expuso a un proceso de liofilización. El procesamiento y análisis posterior de los dispositivos fue idéntico al del Ejemplo 5, *supra*.

La Figura 13 es un gráfico de barras que ilustra la capacidad de una composición orgánica biológicamente compatible en la forma de glicerol y heparina, para mantener la actividad biológica de la heparina inmovilizada en un material de recubrimiento polimérico sobre un material de sustrato, tanto durante como después de la exposición a un régimen de esterilización con ETO y manipulación mecánica en forma de compactación y expansión del sustrato y el material de recubrimiento polimérico en el cual se inmovilizó la heparina. Todas las barras verticales representan los valores medios de n = 3 muestras.

Los materiales de sustrato recubierto con heparina inmovilizada que no recibieron las composiciones orgánicas biológicamente compatibles adicionales de glicerol y heparina y se expusieron a esterilización con ETO y compactación y expansión diametrales mostraron una reducción significativa en la actividad de unión a la antitrombina III (63 pmol/cm²) en comparación con los materiales de control similarmente contruidos y tratados no sometidos a esterilización con ETO ni a compactación y expansión diametrales (158 pmol/cm²). Cuando los materiales de sustrato recubiertos con heparina inmovilizada se trataron con una composición orgánica biológicamente compatible de glicerol y heparina y se expusieron a las mismas condiciones de esterilización con ETO y manipulaciones mecánicas que la construcción no tratada, la actividad de unión a la anti-trombina III de la heparina inmovilizada se mantuvo similar a los materiales de control (147 pmol/cm²).

Ejemplo 7*

Este ejemplo demuestra una actividad relativamente baja de unión a la anti-trombina III de un dispositivo médico recubierto con heparina disponible comercialmente. El dispositivo era un injerto vascular recubierto con heparina de cincuenta centímetros (50 cm) de largo, seis milímetros (6 mm) de diámetro, esterilizado, y empaquetado, disponible bajo el nombre comercial de injerto vascular recubierto con heparina FLOWLINE BIPORE® (número de catálogo 15TW5006N) de JOTEC GmbH (Hechingen, Alemania). Según el fabricante, el injerto vascular tubular está hecho de un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) con heparina unida covalentemente y iónicamente a la superficie luminal del injerto. El fabricante afirma que la heparina está unida de forma estable y permanente al ePTFE. Las superficies del injerto que contiene heparina se dice que son anti-trombóticas.

Se obtuvieron muestras (0,5 cm de largo) del injerto vascular que contiene heparina y se ensayaron como se describe en el Ejemplo 2, *supra*. Al igual que con los materiales de la invención, la actividad de unión a la anti-trombina III del injerto vascular se expresó como picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado del material de sustrato (pmol/cm²). Como en los ejemplos anteriores, se midió sólo el área de la superficie luminal de cada dispositivo y no toda la superficie del dispositivo. Los resultados del ensayo de unión a ATIII mostraron que no había actividad de unión a la anti-trombina III a pesar de las reclamaciones por parte del fabricante de que la heparina biológicamente activa estaba presente en la superficie luminal del injerto vascular. Cabe señalar que el ensayo de actividad de unión a la anti-trombina III es capaz de detectar la actividad de unión a la anti-trombina III a un nivel de aproximadamente cinco picomoles por centímetro cuadrado de material de sustrato (5 pmol/cm² de material de sustrato) y por encima.

Ejemplo 8*

Este ejemplo describe el uso de un agente antibiótico peptídico como una composición orgánica biológicamente compatible conjuntamente con heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato revestido o recubierto. La construcción presentó una unión significativa a ATIII después de exposición a esterilización con ETO.

En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y fue provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2.

La construcción descrita anteriormente se expuso a una solución de bacitracina (72.000 unidades/gramo) a una concentración de 0,5 g por 100 mL de agua desionizada (agua DI) sumergiendo la construcción en cien mililitros (100 mL) de la solución de bacitracina durante tres horas (3 h) a temperatura ambiente. Se retiró la construcción de la solución y se liofilizó antes de la exposición a un procedimiento de esterilización.

En la preparación para esterilización con ETO, cada construcción liofilizada se colocó y se selló en una bolsa de autosellado de una torre DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de

etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

5 Después de esterilización con ETO, se retiró cada construcción de su bolsa y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con una solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH, 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min).

10 Se cortaron de la construcción esterilizada muestras de la membrana (aproximadamente 1 cm²) y la heparina inmovilizada se midió en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron húmedas a lo largo de todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).

La muestra tratada con bacitracina y posteriormente esterilizada con óxido de etileno tenía una actividad de unión a la anti-trombina III de 9 pmol/cm² (n = 3)-

15 Ejemplo 9*

20 Este ejemplo describe la adición de una composición orgánica biológicamente compatible a heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato revestido o recubierto y previamente expuesto a esterilización con ETO. Se seleccionó un agente antibiótico peptídico como la composición orgánica biológicamente compatible en este ejemplo. Una construcción tratada de este modo tuvo una unión significativa de la heparina a ATIII después de exposición a esterilización con ETO.

En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y fue provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2.

25 En la preparación para esterilización con ETO, cada construcción liofilizada, se colocó y se selló en una bolsa de autosellado de una torre DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

30 Después de esterilización con ETO, la construcción se manipuló asépticamente en una cabina de seguridad biológica NUAIRE, clase II, tipo A/B3, modelo UN-425-600 (Plymouth, MN).

35 Se cortaron de la construcción muestras esterilizadas de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm²) de tamaño y se sumergieron en una solución de bacitracina esterilizada por filtración (649,4 mg a 77.000 unidades/g disueltos en 10 mL de solución de irrigación de cloruro de sodio al 0,9 % comprada de Hospira, Inc.) con una concentración resultante de aproximadamente cinco mil (5000) unidades por mL de solución de irrigación de cloruro de sodio al 0,9 % de grado USP. Se expusieron las muestras a la solución de bacitracina durante dos minutos (2 min) a temperatura ambiente.

Se retiraron las muestras de la solución y se lavaron con agua DI durante quince minutos (15 min), con una solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagaron con agua DI durante quince minutos (15 min).

40 Se cortaron muestras del material en forma de lámina (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron húmedas a lo largo de todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).

45 La muestra que fue inicialmente esterilizada con óxido de etileno y posteriormente tratada con bacitracina tenía una actividad de unión a la anti-trombina III de 185 pmol/cm² (n = 3). Como indican estos resultados, se puede mezclar un agente terapéutico con heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto después de que la entidad haya sido esterilizada, sin reducción significativa de su actividad biológica.

Ejemplo 10*

50 Este ejemplo demuestra la heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto que fue mezclada con una composición orgánica biológicamente compatible, esterilizada con ETO, y finalmente tratada con un agente antibiótico peptídico. Una construcción tratada de este modo tiene una unión significativa de heparina a ATIII.

En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ.

bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y fue provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2.

5 La construcción descrita anteriormente se expuso a una solución de polietilenglicol (peso molecular 20.000, Sigma) a una concentración de 0,5 g por 100 mL de agua DI ajustada a pH 9,6. La construcción se puso en un vaso de precipitados y se añadieron cien mililitros (100 mL) para sumergir completamente la construcción en la solución de polietilenglicol. Se expuso la construcción a la solución de polietilenglicol durante una hora (1 h) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se retiró la construcción de la solución y se liofilizó antes de la exposición a un procedimiento de esterilización.

10 En la preparación para esterilización con ETO, la construcción liofilizada, se colocó y se selló en una bolsa de autosellado Convertors® (Cardinal Health, McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

15 Después de esterilización con ETO, la construcción se manipuló asépticamente en una cabina de seguridad biológica NUAIRE, clase II, tipo A/B3, modelo UN-425-600 (Plymouth, MN).

20 Se cortaron de la construcción muestras esterilizadas de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm²) de tamaño y se sumergieron en una solución de bacitracina esterilizada por filtración (649,4 mg a 77.000 unidades/g disueltos en 10 mL de solución de irrigación de cloruro de sodio al 0,9 %) con una concentración resultante de aproximadamente cinco mil (5.000) unidades por mL de solución de irrigación de cloruro de sodio al 0,9 % grado USP. Se expusieron las muestras a la solución de bacitracina durante dos minutos (2 min) a temperatura ambiente.

Se retiraron las muestras de la solución y se lavaron con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagaron con agua DI durante quince minutos (15 min).

25 Se cortaron muestras de la membrana (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron húmedas a lo largo de todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).

30 La muestra que fue inicialmente tratada con polietilenglicol, esterilizada con óxido de etileno y después tratada con bacitracina, tenía una actividad de unión a la anti-trombina III de 195 pmol/cm² (n = 3). Por lo tanto, un material de sustrato recubierto esterilizado con heparina biológicamente activa inmovilizada sobre el mismo y una primera composición orgánica biológicamente compatible (PEG) mezclada con ellos se pueden tratar además con una segunda composición orgánica biológicamente compatible (bacitracina) después de esterilización con ETO y mantienen una actividad significativa de unión a ATIII.

35 Ejemplo 11*

40 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la posterior unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (dextrano activado con aldehído) al material de recubrimiento. Esta composición se expuso a esterilización con ETO y después de ella demostró una significativa actividad biológica de heparina.

En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406). Este material de ePTFE fue provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2, sin embargo, la construcción se conservó en agua DI después de haber sido recubierta, en lugar de ser liofilizada.

45 La construcción descrita anteriormente recubierta con un material de recubrimiento se expuso a una solución de dextrano activado con aldehído (peso molecular 40.000, Pierce) (0,050 g de dextrano activado con aldehído, 2,93 g de NaCl disueltos en 100 mL de agua DI, pH 5,5) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 0,286 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ a cien mililitros (100 mL) de solución de dextrano activado con aldehído antes de añadir la muestra.

50 Se retiró la construcción de la solución de dextrano activado con aldehído y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE.

55 En la preparación para esterilización con ETO, la construcción liofilizada, se colocó y se selló en una bolsa de

autosellado Convertors® (Cardinal Health, McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

- 5 Se cortaron muestras de la membrana esterilizada (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).

- 10 La muestra preparada como se ha descrito en este ejemplo, tenía una actividad media de unión a la anti-trombina III de 65 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que, en adición a la heparina unida en el punto extremo unida covalentemente, una composición orgánica biológicamente compatible, puede estar unida covalentemente a la capa de recubrimiento a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina después de esterilización con ETO.

Ejemplo 12*

- 15 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la posterior unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (dextrano activado con aldehído, peso molecular 1000) al material de recubrimiento. Esta composición se expuso a esterilización con ETO y después de ella demostró una significativa actividad biológica de la heparina.

- 20 En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406), Este material de ePTFE fue provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2, sin embargo, la construcción se conservó en agua DI después de haber sido recubierta, en lugar de ser liofilizada.

- 25 La construcción descrita anteriormente recubierta con un material de recubrimiento se expuso a una solución de PEG activado con aldehído (peso molecular 1000, Nanocs) (0,20 g de PEG, 3,90 g de NaCl disueltos en 133 mL de agua DI, pH 5,5) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 0,380 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ a cien mililitros (100 mL) de solución de PEG antes de añadir la muestra.

- 30 Se retiró la construcción de la solución de PEG y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE.

- 35 En la preparación para esterilización con ETO, la construcción liofilizada, se colocó y se selló en una bolsa de autosellado Convertors® (Cardinal Health, McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

- 40 Se cortaron muestras de la membrana esterilizada (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).

- 45 La muestra preparada como se ha descrito en este ejemplo, tenía una actividad media de unión a la anti-trombina III de 96 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que, en adición a la heparina unida en el punto extremo unida covalentemente, una composición orgánica biológicamente compatible, puede estar unida covalentemente a la capa de recubrimiento a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina.

Ejemplo 13*

- 50 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la posterior unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (polietilenglicol activado con aldehído, peso molecular 5000) con el material de revestimiento o recubrimiento. Esta composición se expuso a esterilización con ETO y después de ella demostró una significativa actividad biológica de la heparina.

- 55 En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406), Este material de ePTFE fue provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2, sin embargo, la construcción se conservó en agua DI después de haber sido recubierta, en lugar de ser liofilizada.

- La construcción descrita anteriormente recubierta con un material de recubrimiento se expuso a una solución de PEG activado con aldehído (peso molecular 5000, Nanocs) (0,20 g de PEG, 3,90 g de NaCl disueltos en 133 mL de agua DI, pH 5,5) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 0,380 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ a cien mililitros (100 mL) de solución de PEG antes de añadir la muestra.
- 5 Se retiró la construcción de la solución de PEG y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE.
- 10 En la preparación para esterilización con ETO, la construcción liofilizada, se colocó y se selló en una bolsa de autosellado Convertors® (Cardinal Health, McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).
- 15 Se cortaron muestras de la membrana esterilizada (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).
- 20 La muestra preparada como se ha descrito en este ejemplo, tenía una actividad media de unión a la anti-trombina III de 64 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que, en adición a la heparina unida en el punto extremo unida covalentemente, una composición orgánica biológicamente compatible, puede estar unida covalentemente a la capa de recubrimiento a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina.

Ejemplo 14*

- 25 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la posterior unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (heparina USP activada con EDC) al material de recubrimiento. Esta composición se expuso a esterilización con ETO y después de ella demostró una significativa actividad biológica de la heparina.
- 30 En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406), Este material de ePTFE fue provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2, sin embargo, la construcción se conservó en agua DI después de haber sido recubierta, en lugar de ser liofilizada.
- 35 Se unió o se conjugó la heparina grado USP a la capa o capas de PEI que ya contenían heparina unida en el punto extremo, colocando la construcción en una solución de sal de cloruro de sodio (1,5 g de heparina USP, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se transfirieron las construcciones a una solución 0,1 M de MES [ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfónico], solución salina tamponada de MES BupH™ (Pierce), 1,5 g de heparina USP, 29,3 g de NaCl, 0,20 g de hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC), y 0,13 g de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) disueltos en 1 L de agua DI a pH 5,5 durante 4 horas (4 h) a temperatura ambiente.
- 40 Se retiró la construcción de la solución descrita antes, y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE.
- 45 En la preparación para esterilización con ETO, la construcción liofilizada, se colocó y se selló en una bolsa de autosellado Convertors® (Cardinal Health, McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).
- 50 Se cortaron muestras de la membrana esterilizada (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).
- 55 La muestra preparada como se ha descrito en este ejemplo, tenía una actividad media de unión a la anti-trombina III de 31 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que, en adición a la heparina unida en el punto extremo unida covalentemente, una composición orgánica biológicamente compatible, puede estar unida covalentemente a la capa de recubrimiento a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina.

Ejemplo 15*

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por una unión covalente secundaria de la heparina a la capa de recubrimiento. Para conseguir la unión covalente secundaria de la heparina unida en el punto extremo, se activan los grupos de ácido carboxílico con EDC y se hacen reaccionar con los grupos de amina primaria restantes presentes en la capa de recubrimiento. Esta composición se expuso a esterilización con ETO y después de ella demostró una significativa actividad biológica de la heparina.

En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406). Este material de ePTFE fue provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2, sin embargo, la construcción se conservó en agua DI después de haber sido recubierta, en lugar de ser liofilizada. Se transfirieron las membranas a una solución 0,1 M de MES [ácido 2-(N-morfolino)etano-sulfónico], solución salina tamponada de MES BupH™ (Pierce), 29,3 g de NaCl, 0,20 g de hidrocloreuro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC), y 0,13 g de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) disueltos en 1 L de agua DI a pH 5,5 durante 4 horas (4 h) a temperatura ambiente.

Se retiró la construcción de la solución descrita antes, y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se enjuagó con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE.

En la preparación para esterilización con ETO, la construcción liofilizada, se colocó y se selló en una bolsa de autosellado Convertors® (Cardinal Health, McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de ETO gas de una hora (1 h), una temperatura de ajuste de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

Se cortaron muestras de la membrana esterilizada (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a la actividad de unión a la anti-trombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Los resultados se expresaron como picomoles de anti-trombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).

La muestra preparada como se ha descrito en este ejemplo, tenía una actividad media de unión a la anti-trombina III de 20 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que, en adición a la unión covalente en el punto extremo, la heparina puede estar además unida covalentemente a una capa de recubrimiento, a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina después de la esterilización con ETO.

Ejemplo 16*

Este ejemplo describe el uso de un agente antibiótico peptídico como una composición orgánica biológicamente compatible conjuntamente con heparina biológicamente activa que es inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto. La construcción tiene una actividad de unión a ATIII mayor que 5 pmol/cm² después de compactación y expansión mecánicas.

En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Se aplica entonces bacitracina utilizando las condiciones descritas en el Ejemplo 8. Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan entonces mecánicamente, se expanden mecánicamente, se enjuagan, se cortan para análisis, y se ensayan en cuanto a unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

La muestra tratada con bacitracina y posteriormente compactada y expandida tiene una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 17*

Este ejemplo describe la adición de una composición orgánica biológicamente compatible a la heparina biológicamente activa que es inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto y previamente compactada y expandida. Se selecciona un agente antibiótico peptídico como la composición orgánica biológicamente compatible. Una construcción tratada de este modo tiene una unión de heparina a ATIII significativa después de compactación y expansión.

En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3 y se compactan y se expanden mecánicamente como se describe en el Ejemplo 5. La prótesis endoluminal se trata entonces con bacitracina y se enjuaga como se describe en el Ejemplo 9. Las prótesis endoluminales heparinizadas se cortan entonces para análisis, y se ensayan en cuanto a unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

Una muestra heparinizada que es compactada y expandida, seguido por la adición de bacitracina, tiene una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 18*

5 Este ejemplo describe heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto. La heparina biológicamente activa inmovilizada se mezcla con una composición orgánica biológicamente compatible, se compacta mecánicamente, se expande mecánicamente, y se trata con un agente antibiótico peptídico, Una construcción tratada de este modo tiene una unión de heparina a ATIII significativa después de la exposición a manipulación mecánica.

10 Las prótesis endoluminales se tratan y se ensayan como se describe en el Ejemplo 17 con una excepción; se mezcla polietilenglicol con la prótesis endoluminal heparinizada, como se describe en el Ejemplo 10, antes de la compactación y expansión.

Una muestra heparinizada mezclada con una composición orgánica biológicamente compatible que es compactada y expandida, seguido por la adición de bacitracina, tiene una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

15 Ejemplo 19*

20 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (dextrano activado con aldehído) al material de recubrimiento. Esta composición se expone a compactación y expansión mecánicas y después de esto demuestra una significativa actividad biológica de la heparina.

25 En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Se inmoviliza dextrano activado con aldehído sobre la capa de recubrimiento como se describe en el Ejemplo 11. Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan entonces mecánicamente, se expanden mecánicamente, se cortan para análisis, y se ensayan en cuanto a unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tiene una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 20*

30 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la subsiguiente unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (polietilenglicol activado con aldehído, peso molecular 1000) al material de recubrimiento. Esta composición se expone a compactación y expansión mecánicas y después de esto demuestra una significativa actividad biológica de la heparina.

35 En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Se inmoviliza polietilenglicol activado con aldehído sobre la capa de recubrimiento como se describe en el Ejemplo 12. Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan entonces, se expanden, se cortan para análisis, y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tiene una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

40 Ejemplo 21*

45 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la subsiguiente unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (polietilenglicol activado con aldehído, peso molecular 5000) al material de recubrimiento. Esta composición se expone a compactación y expansión mecánicas y después de esto demuestra una actividad biológica de la heparina significativa.

En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Se inmoviliza polietilenglicol activado con aldehído sobre la capa de recubrimiento como se describe en el Ejemplo 13. Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan entonces, se expanden, se cortan para análisis, y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

50 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tiene una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 22*

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la subsiguiente unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (heparina USP activada con EDC) al material de recubrimiento. Esta composición se expone a compactación y expansión mecánicas y después de esto demuestra una actividad biológica de la heparina significativa.

En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Se inmoviliza heparina USP sobre la capa de recubrimiento como se describe en el Ejemplo 14. Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan entonces, se expanden, se cortan para análisis, y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tiene una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 23*

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por una unión covalente secundaria de la heparina a grupos reactivos de la capa de recubrimiento. Para conseguir la unión covalente secundaria de la heparina unida en el punto extremo, los grupos de ácido carboxílico se activan con EDC y se hacen reaccionar con los grupos de amina primaria restantes presentes en la capa de recubrimiento. La composición se expone a compactación y expansión mecánicas. Después de esto la construcción demuestra una actividad biológica de la heparina significativa.

En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Una posterior unión covalente de la heparina inmovilizada con la capa de recubrimiento se realiza como se describe en el Ejemplo 15.

Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan entonces mecánicamente, se expanden mecánicamente, se cortan para análisis, y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 24*

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la unión adicional de una composición orgánica biológicamente compatible mediante un enlace lábil al material de recubrimiento. El enlace lábil permite la administración local de un compuesto terapéutico a la vez que la heparina unida de manera estable mantiene una actividad de unión a ATIII significativa después de la esterilización y compactación y expansión mecánicas.

En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Una heparina modificada con aldehído es unida en el punto extremo a la capa de recubrimiento mediante un enlace lábil colocando la construcción en una solución de sal de cloruro de sodio que contiene heparina (1,5 g de heparina modificada con aldehído, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Es importante observar que el agente reductor; NaCHBH₃, no se añade durante esta segunda conjugación de heparina modificada con aldehído. El enlace formado entre las aminas primarias y los aldehídos, cuando permanecen en estado no reducido, es lábil. Las muestras se enjuagan entonces con agua DI durante 15 minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE.

Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan entonces como se describe en el Ejemplo 5 y se esterilizan como se describe en el Ejemplo 3. Se expanden después, se cortan para análisis, y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 25*

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la unión adicional de una composición orgánica biológicamente compatible mediante un enlace lábil al material de

recubrimiento. El enlace lábil permite la administración local de un compuesto terapéutico a la vez que la heparina unida de manera estable mantiene una actividad de unión a ATIII significativa después de la compactación y la expansión mecánicas

- 5 En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Una heparina adicional modificada con aldehído es unida en el punto extremo a la capa de recubrimiento mediante un enlace lábil covalente colocando la construcción en una solución de sal de cloruro de sodio que contiene heparina (1,5 g de heparina modificada con aldehído, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Es importante observar que el agente reductor; NaCHBH₃, no se añade durante esta segunda conjugación de heparina modificada con aldehído. El enlace formado entre las aminas primarias y los aldehídos, cuando permanecen en el estado no reducido, es lábil. Las muestras se enjuagan entonces con agua DI durante 15 minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE.
- 10
- 15 Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan entonces, se expanden, se cortan para análisis, y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 26*

- 20 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la unión adicional de una composición orgánica biológicamente compatible mediante un enlace lábil al material de recubrimiento. El enlace lábil permite la administración local de un compuesto terapéutico a la vez que la heparina unida de manera estable mantiene una actividad de unión a ATIII significativa después de la esterilización con ETO
- 25 En este ejemplo, se obtiene un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y es provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2. Una heparina adicional modificada con aldehído es unida en el punto extremo a la capa de recubrimiento mediante un enlace lábil covalente colocando la construcción en una solución de sal de cloruro de sodio que contiene heparina (1,5 g de heparina modificada con aldehído, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Es importante observar que el agente reductor; NaCHBH₃, no se añade durante esta segunda conjugación de heparina modificada con aldehído. El enlace formado entre las aminas primarias y los aldehídos, cuando permanecen en el estado no reducido, es lábil. Las muestras se enjuagan entonces con agua DI durante 15 minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca unida al material de ePTFE.
- 30
- 35

El material heparinado se esteriliza entonces, se corta para análisis, y se ensaya en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 2.

- 40 Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 27*

- 45 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la subsiguiente unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (polietilenglicol activado con aldehído) al material de recubrimiento con la adición final de una composición orgánica biológicamente compatible mezclada de manera no covalente (bacitracina). Esta composición se expone a esterilización con ETO y después demuestra una actividad biológica de heparina significativa
- 50 En este ejemplo, se obtiene un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y es provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2. Un polietilenglicol (peso molecular 1000) activado con aldehído se une covalentemente al material de recubrimiento como se describe en el Ejemplo 12 y se mezcla entonces bacitracina de manera no covalente con esta composición como se describe en el Ejemplo 8. Se esteriliza entonces la composición y se toman muestras como se describe en el Ejemplo 8 y la heparina inmovilizada se mide en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 2.
- 55

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión a la anti-trombina III

mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 28*

5 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la subsiguiente unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (polietilenglicol activado con aldehído) al material de recubrimiento con la adición final de una composición orgánica biológicamente compatible mezclada de manera no covalente (bacitracina). Esta composición se expone a compactación y expansión mecánicas y después demuestra una actividad biológica de heparina significativa

10 En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Un polietilenglicol (peso molecular 1000) activado con aldehído se une covalentemente al material de recubrimiento como se describe en el Ejemplo 12 y se mezcla entonces bacitracina de manera no covalente con esta composición como se describe en el Ejemplo 8. Entonces las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan mecánicamente, se expanden mecánicamente, se cortan para análisis, se enjuagan y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

15 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tiene una actividad de unión a la anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 29*

20 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la subsiguiente unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (dextrano activado con aldehído) al material de recubrimiento con la adición final de una composición orgánica biológicamente compatible mezclada de manera no covalente (dexametasona). Esta composición se expone a esterilización con ETO y después demuestra una actividad biológica de heparina significativa

25 En este ejemplo, se obtiene un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y es provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2. Se une covalentemente dextrano activado con aldehído al material de recubrimiento como se describe en el Ejemplo 11 y se mezcla entonces dexametasona de manera no covalente con esta composición que se esteriliza después y se toman muestras como se describe en el Ejemplo 2. La heparina inmovilizada se mide en cuanto a la unión a ATIII utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito en el Ejemplo 2.

30 Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión a la anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 30*

35 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la subsiguiente unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (dextrano activado con aldehído) al material de recubrimiento con la adición final de una composición orgánica biológicamente compatible mezclada de manera no covalente (dexametasona). Esta composición se expone a compactación y expansión mecánicas y después demuestra una actividad biológica de heparina significativa

40 En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Dextrano activado con aldehído se une covalentemente al material de recubrimiento como se describe en el Ejemplo 11 y se mezcla entonces dexametasona de manera no covalente con esta composición como se describe en el Ejemplo 2. Entonces las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan mecánicamente, se expanden mecánicamente, se cortan para análisis, se enjuagan y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

45 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tiene una actividad de unión a la anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 31*

50 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la unión adicional de una composición orgánica biológicamente compatible (polietilenglicol) mediante un enlace lábil al material de recubrimiento, con la adición final de una composición orgánica biológicamente compatible mezclada de manera no covalente (dexametasona). Esta composición se expone a esterilización con ETO y después demuestra una actividad biológica de heparina significativa

En este ejemplo, se obtiene un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ. bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y es provisto con un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al del Ejemplo 2. Se une a la capa de recubrimiento polietilenglicol (peso molecular 1000) modificado con aldehído mediante un enlace covalente lábil utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 12 incluyendo la adición de NaCHBH₃. Es importante observar que el agente reductor; NaCHBH₃, no se añade durante la conjugación de polietilenglicol modificado con aldehído. El enlace formado entre las aminas primarias y los aldehídos, cuando permanecen en estado no reducido, es lábil. Las muestras se enjuagan entonces con agua DI durante 15 minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca y polietilenglicol unidos al material de ePTFE. Entonces se añade y se mezcla dexametasona de manera no covalente con esta composición como se describe en el Ejemplo 2. El material heparinizado se esteriliza después, se toman muestras, y se mide la actividad de unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 2.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

Ejemplo 32*

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la unión adicional de una composición orgánica biológicamente compatible (polietilenglicol) mediante un enlace lábil al material de recubrimiento, con la adición final de una composición orgánica biológicamente compatible mezclada de manera no covalente (dexametasona). Esta composición se expone a compactación y expansión mecánicas y después demuestra una actividad biológica de heparina significativa

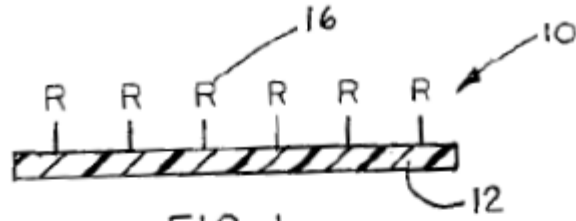
En este ejemplo, dispositivos médicos implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizan como se describe en el Ejemplo 3. Polietilenglicol (peso molecular 1000) modificado con aldehído se une a la capa de recubrimiento mediante un enlace covalente lábil utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 12 excluyendo la adición de NaCHBH₃. Es importante observar que el agente reductor; NaCHBH₃, no se añade durante la conjugación de polietilenglicol modificado con aldehído. El enlace formado entre las aminas primarias y los aldehídos, cuando permanecen en estado no reducido, es lábil. Las muestras se enjuagan entonces con agua DI durante 15 minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de la construcción entera para producir heparina seca y polietilenglicol unidos al material de ePTFE. Entonces se añade y se mezcla dexametasona de manera no covalente con esta composición como se describe en el Ejemplo 2. Entonces las prótesis endoluminales heparinizadas se compactan mecánicamente, se expanden mecánicamente, se cortan para análisis, se enjuagan y se ensayan en cuanto a la unión a ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión a anti-trombina III mayor que 5 pmol/cm².

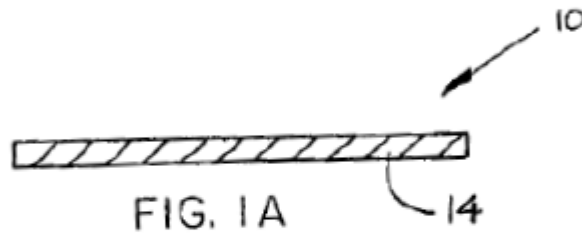
REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo médico que comprende:
- un material de sustrato;
- 5 un material de recubrimiento polimérico unido a al menos una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de entidades biológicamente activas que tienen actividad de unión a la anti-trombina III unidas covalentemente a al menos una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, siendo dichas entidades biológicamente activas oligosacáridos o polisacáridos; y
- 10 una composición orgánica biológicamente compatible que es un polisacárido combinado de manera no covalente con dicho material de recubrimiento polimérico, siendo dicho polisacárido un glucosaminoglucano, dextrano o sulfato de dextrano,
- en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 5 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, después de la esterilización o compactación y expansión de dicho material de sustrato.
- 15 2. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 6 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.
3. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 7 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.
- 20 4. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 8 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.
- 25 5. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 9 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.
6. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 10 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.
- 30 7. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión a la anti-trombina III de al menos 100 picomoles de anti-trombina III por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.
8. El dispositivo médico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde al menos una porción de dicha composición orgánica biológicamente compatible se libera de dicho dispositivo médico en una solución tampón de fosfato 0,15 M que tiene una temperatura de aproximadamente treinta y siete grados centígrados y un pH sustancialmente neutro.
- 35 9. El dispositivo médico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas comprende un glucosaminoglucano.
10. El dispositivo médico de la reivindicación 9, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas comprende heparina unida en el punto extremo.
- 40 11. El dispositivo médico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha composición orgánica biológicamente compatible que es un polisacárido, es heparina.
12. El dispositivo médico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha composición orgánica biológicamente compatible que es un polisacárido, es dextrano.
- 45 13. El dispositivo médico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha composición orgánica biológicamente compatible que es un polisacárido, es sulfato de dextrano.
14. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicho material de recubrimiento polimérico comprende múltiples capas, en donde los componentes químicos de al menos una capa están reticulados.
15. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicho material de sustrato es de composición polimérica.
- 50 16. El dispositivo médico de la reivindicación 15, en donde dicho material de sustrato polimérico es de composición fluoropolimérica.

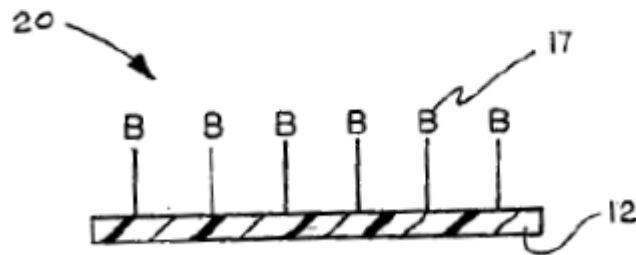
17. El dispositivo médico de la reivindicación 16, en donde dicho material fluoropolimérico es politetrafluoroetileno.
18. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicho material de sustrato es de composición metálica.
19. El dispositivo médico de la reivindicación 18, en donde dicha composición metálica es una aleación metálica de níquel y titanio.
- 5 20. El dispositivo médico de la reivindicación 18, en donde dicha composición metálica es acero inoxidable.
21. El dispositivo médico de la reivindicación 1, en donde dicho material de recubrimiento polimérico comprende al menos una capa de polietilen-imina.
22. El dispositivo médico de cualquier reivindicación precedente, que comprende además una segunda composición biológicamente compatible mezclada con el mismo, antes de la esterilización o compactación y expansión de dicho dispositivo.
- 10 23. El dispositivo médico de la reivindicación 22, en donde dicha segunda composición biológicamente compatible es un agente antiproliferativo.
24. El dispositivo médico de la reivindicación 23, en donde dicho agente antiproliferativo es dexametasona.
25. El dispositivo médico de cualquier reivindicación precedente, que comprende una segunda composición biológicamente compatible mezclada con el mismo, después de la esterilización o compactación y expansión de dicho dispositivo.
- 15 26. El dispositivo médico de la reivindicación 25, en donde dicha segunda composición biológicamente compatible es un agente antimicrobiano.
27. El dispositivo médico de la reivindicación 26, en donde dicho agente antimicrobiano es bacitracina.
- 20 28. Un dispositivo médico según la reivindicación 1, que comprende un material de sustrato con una pluralidad de entidades químicas que tienen actividad de unión a la anti-trombina III presentes sobre al menos una porción de una superficie de dicho material de sustrato, en donde al menos el noventa por ciento de dicha actividad de unión a la anti-trombina III se mantiene después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato.
- 25 29. Un dispositivo médico esterilizado según la reivindicación 1, que comprende un material de sustrato con una pluralidad de entidades químicas que tienen actividad de unión a la anti-trombina III presentes sobre al menos una porción de una superficie de dicho material de sustrato, en donde al menos el noventa por ciento de dicha actividad de unión a la anti-trombina III se mantiene después de la esterilización de dichas entidades químicas.



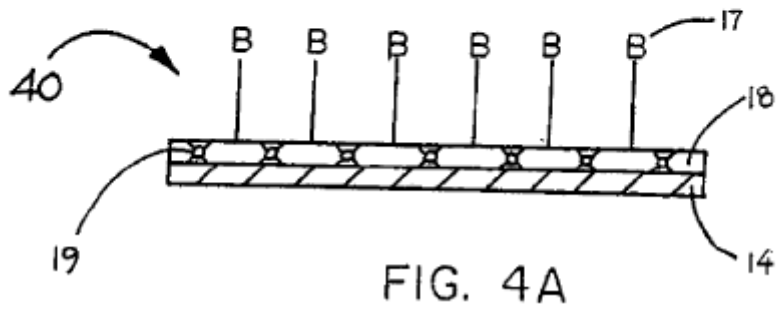
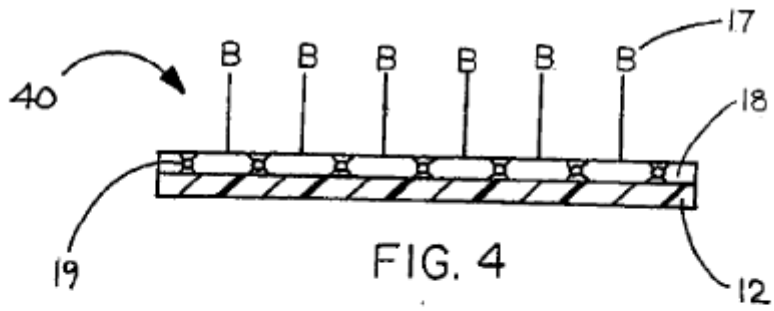
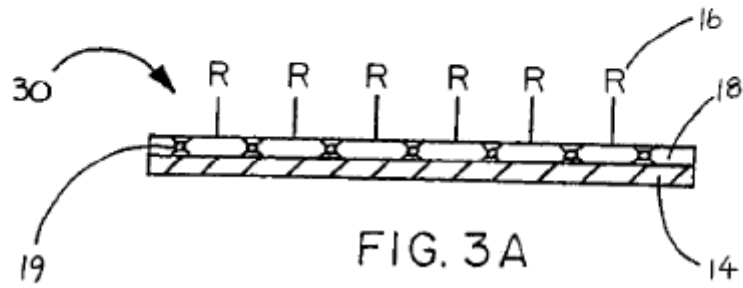
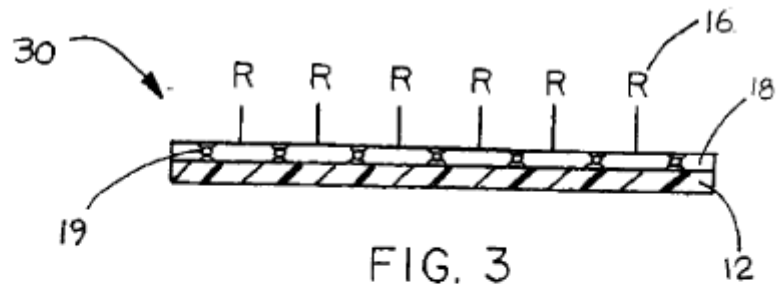
TÉCNICA ANTERIOR



TÉCNICA ANTERIOR



TÉCNICA ANTERIOR



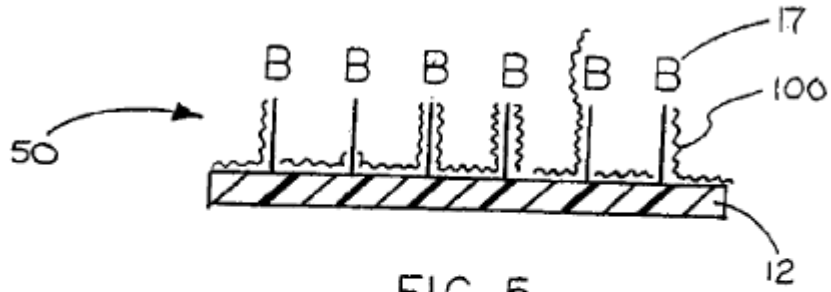


FIG. 5

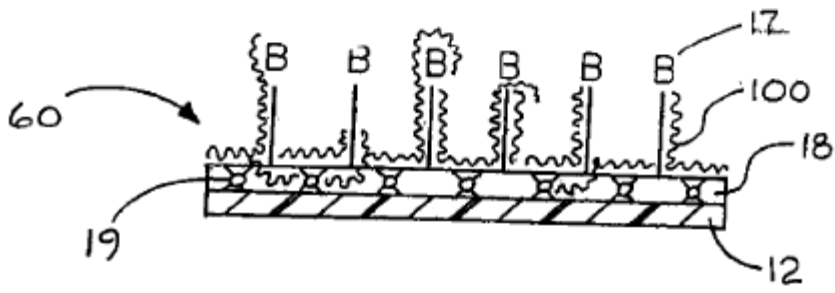


FIG. 6

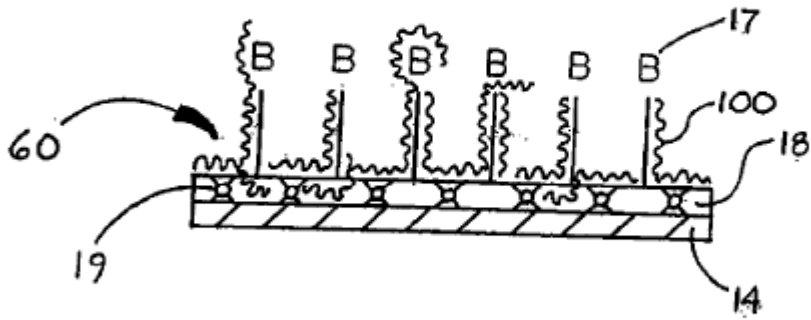


FIG. 6A

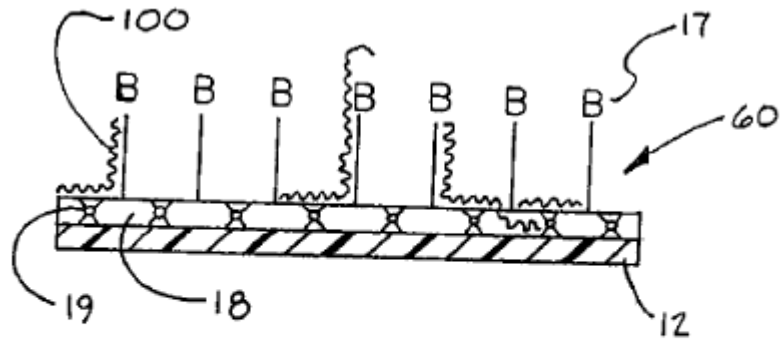


FIG. 6 B

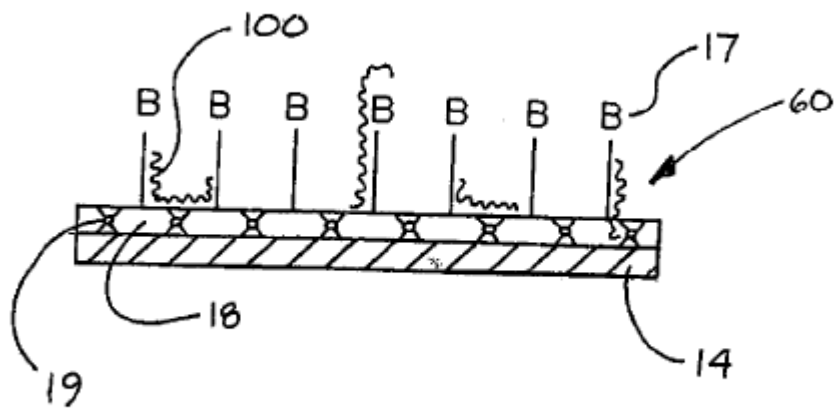
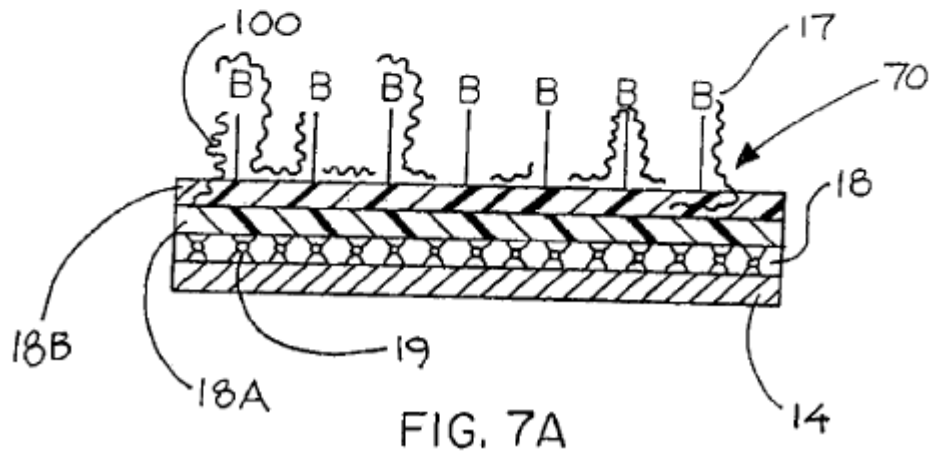
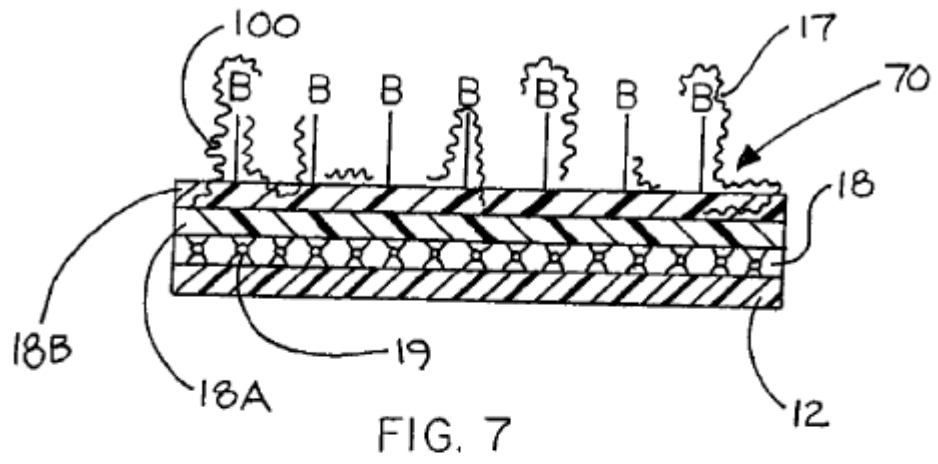
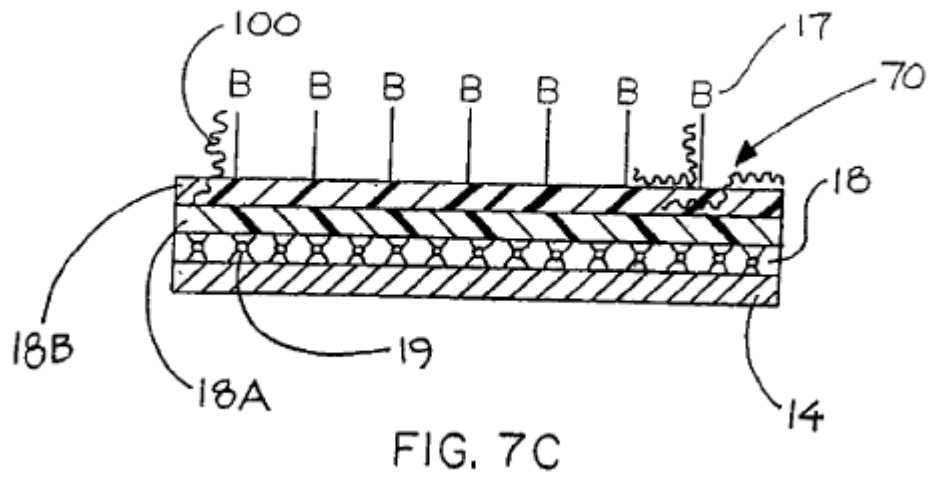
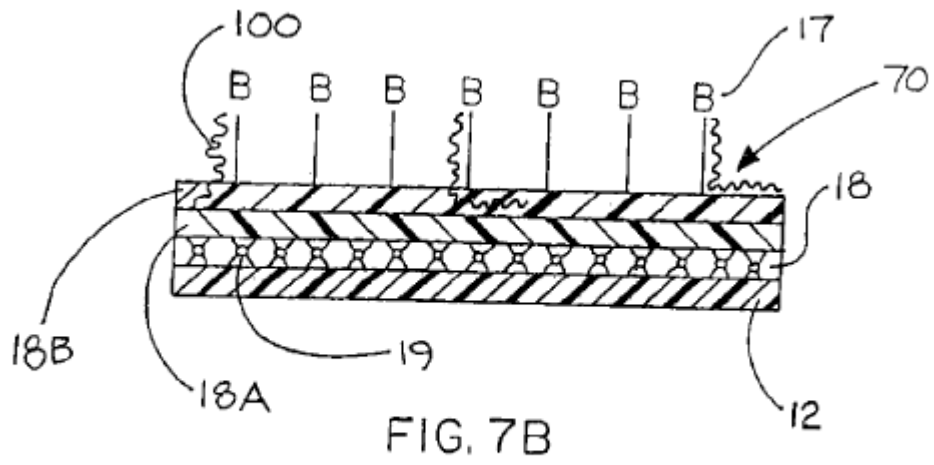


FIG. 6 C





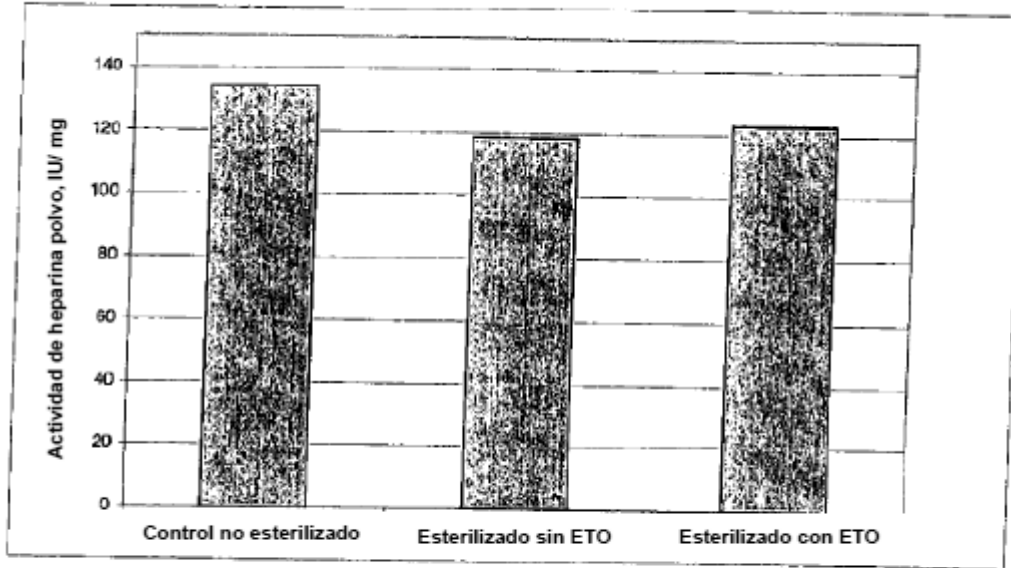


Figura 8

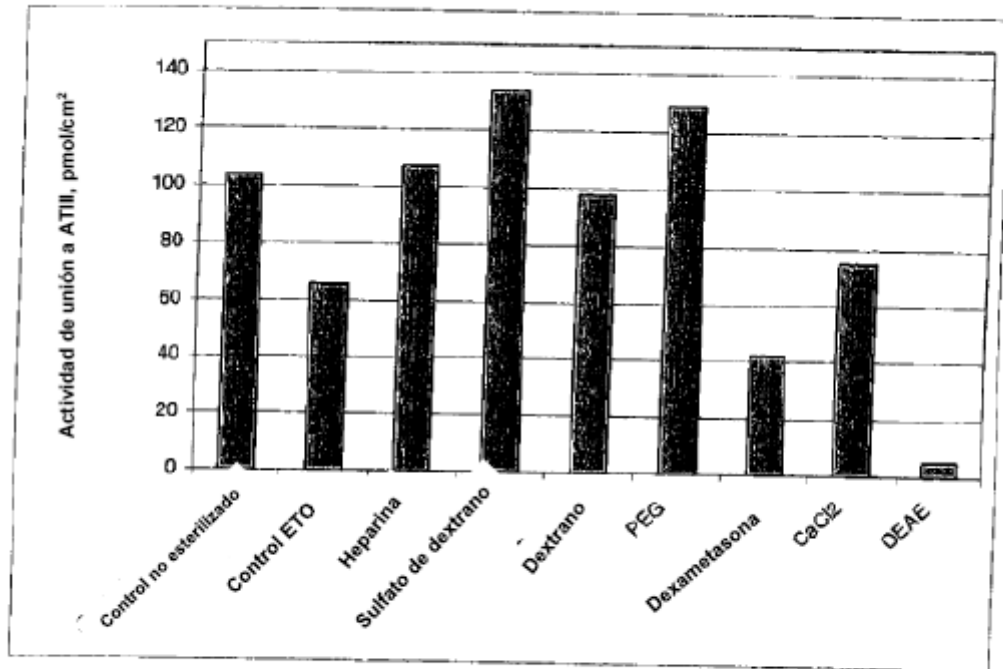


Figura 9

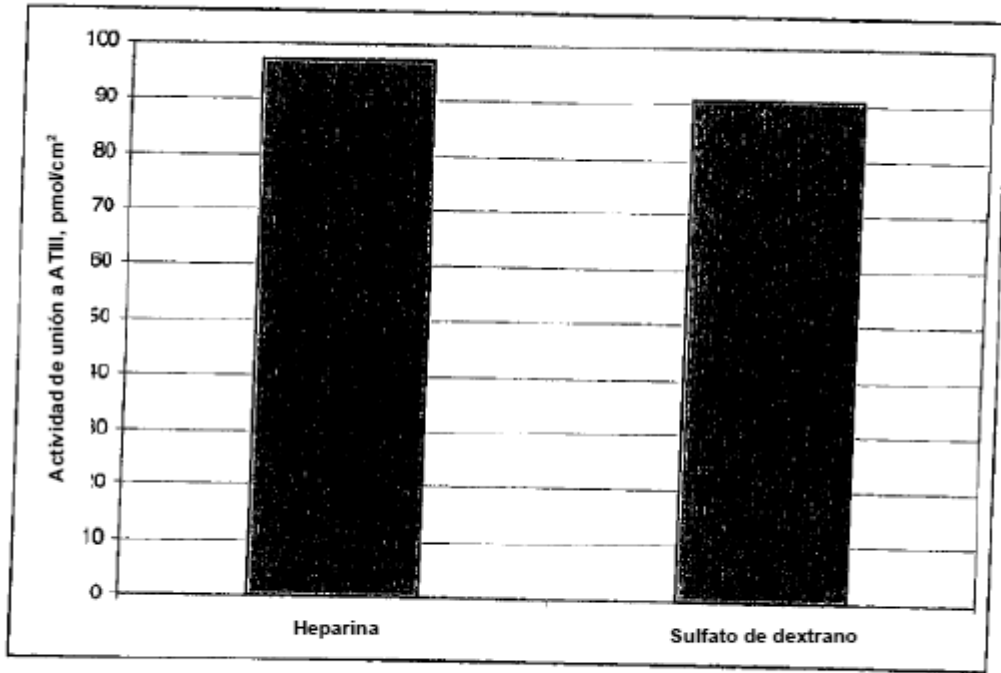


Figura 10

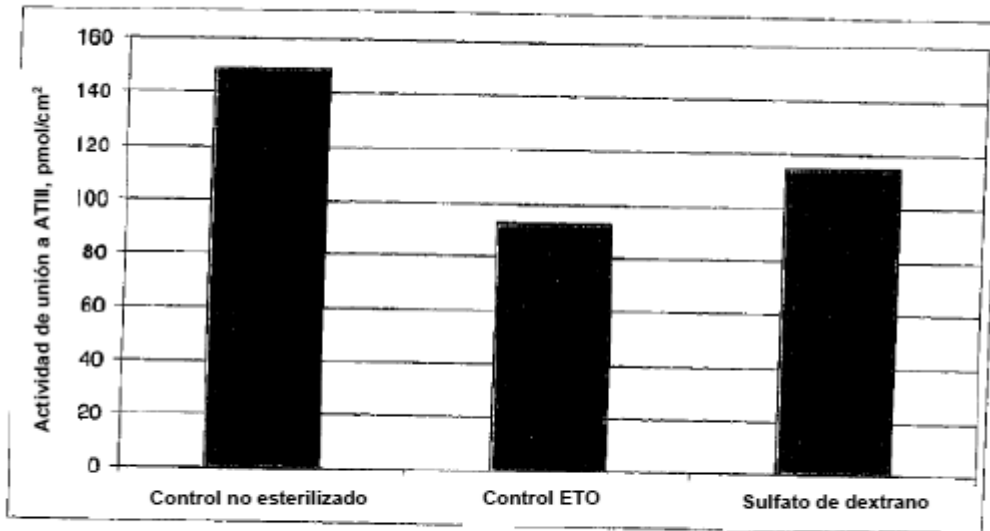


Figura 11

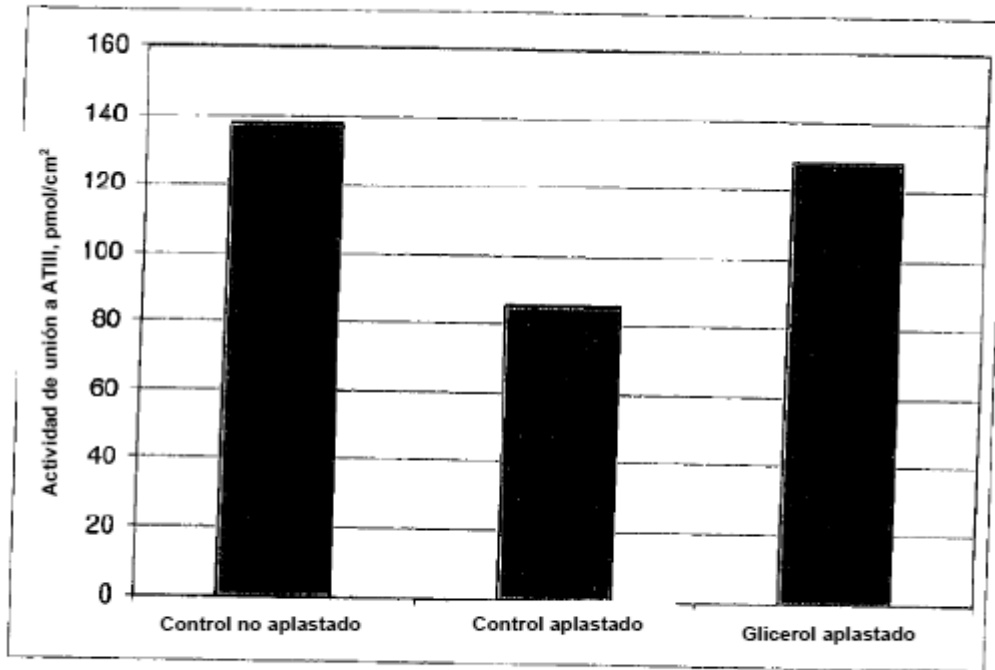


Figura 12

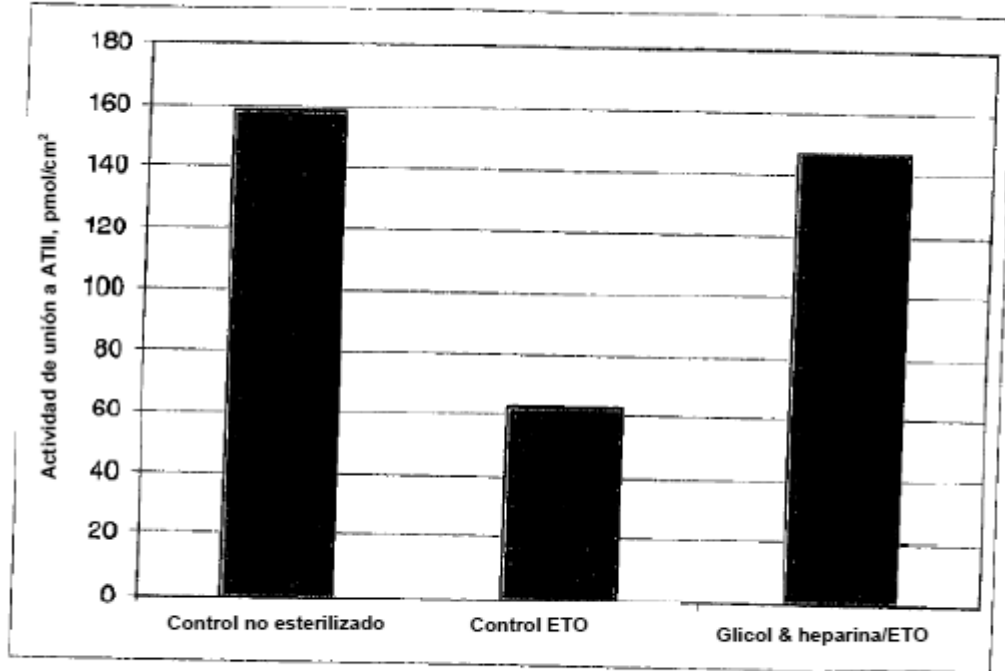


Figura 13

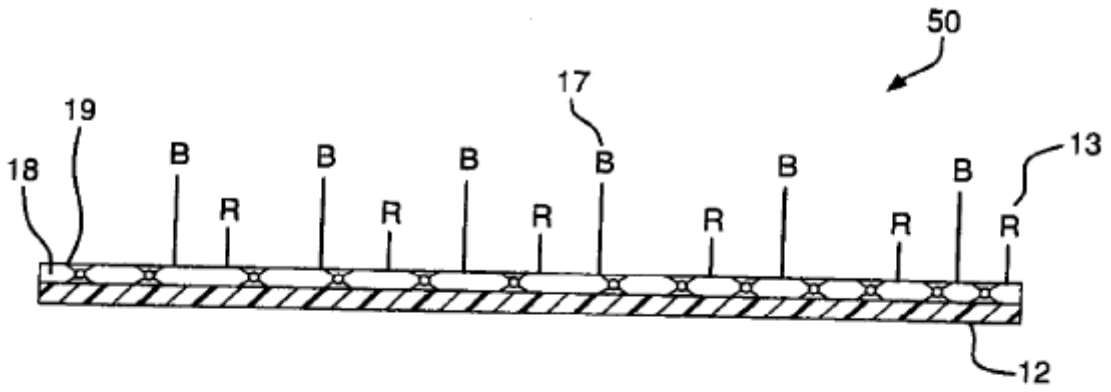


FIG. 14

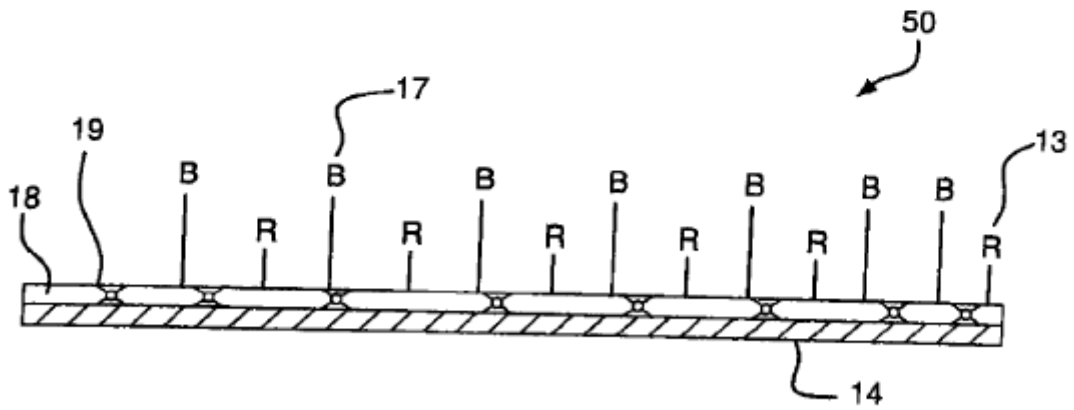


FIG. 15

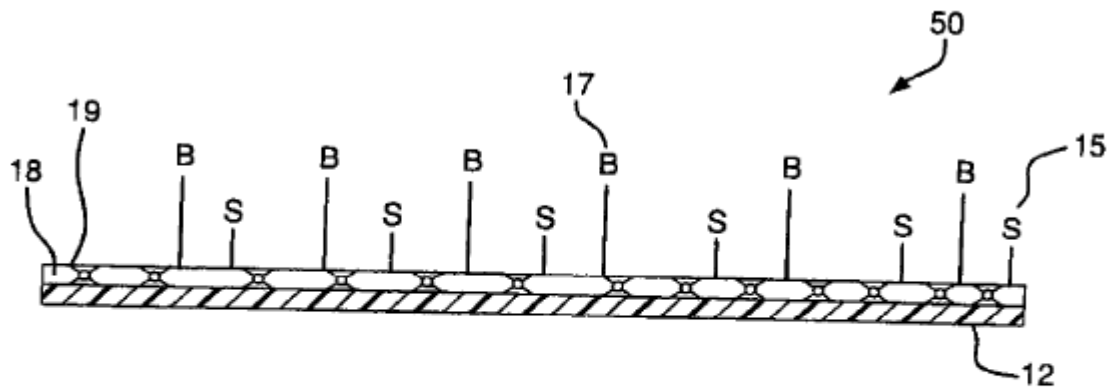


FIG. 16

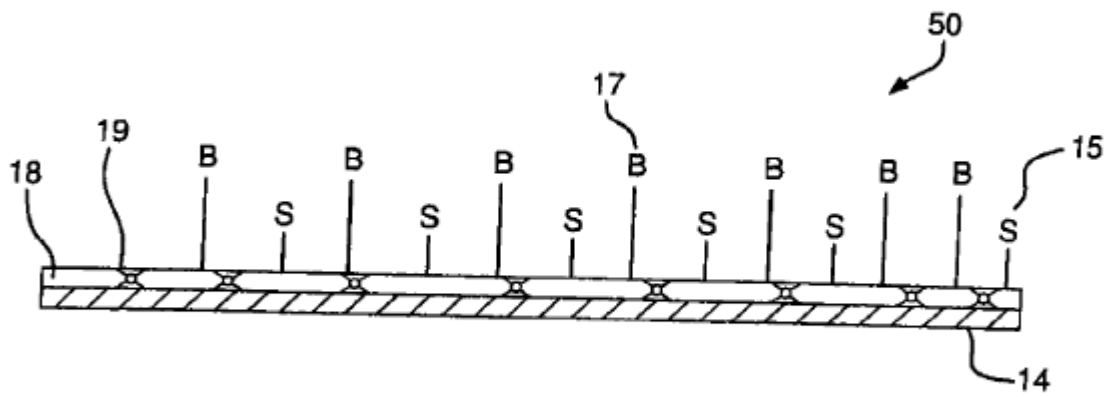


FIG. 17

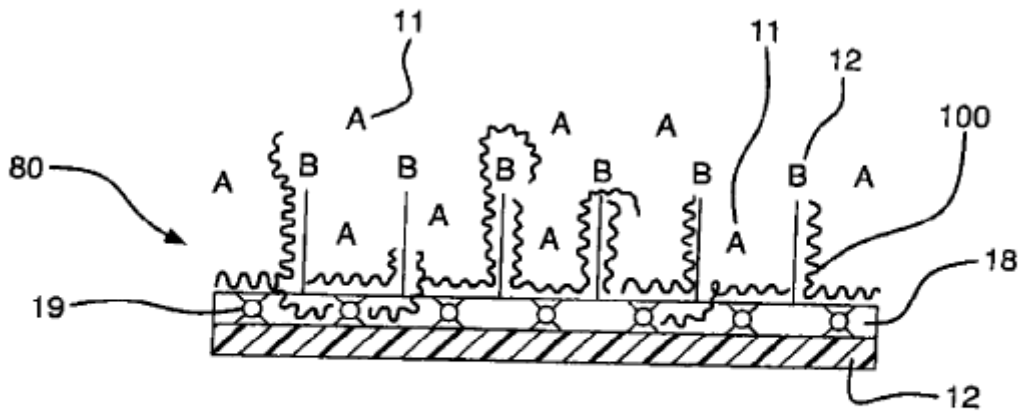


FIG. 20

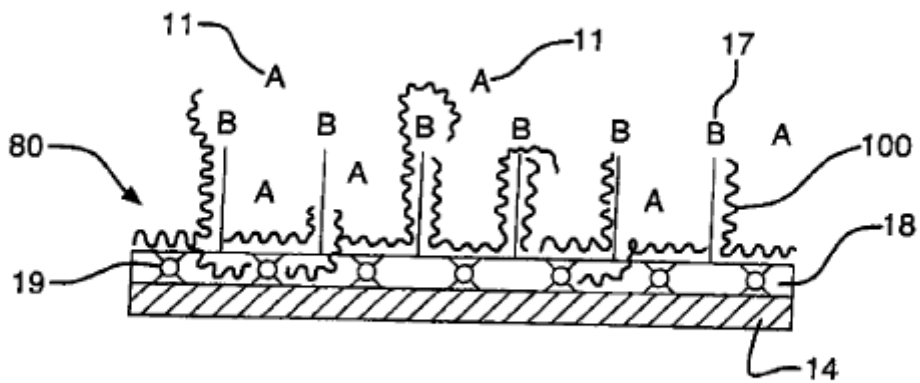


FIG. 21