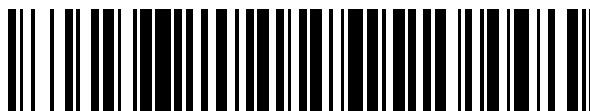


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 210**

51 Int. Cl.:

A61L 33/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2014** **PCT/EP2014/074380**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015** **WO15071313**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2014** **E 14801976 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 3068454**

54 Título: **Poliuretano que tiene un revestimiento antitrombogénico**

30 Prioridad:

14.11.2013 EP 13192956

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

02.08.2017

73 Titular/es:

pfm medical titanium gmbh (100.0%)
Südwestpark 42
90449 Nürnberg, DE

72 Inventor/es:

STADTHERR, KARIN;
SCHMID, CHRISTOF;
LEHLE, KARLA;
LUKAS, KARIN;
ZIMMERMANN, HANNGÖRG;
WEHNER, DANIEL y
SCHMID, THOMAS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 628 210 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

Poliuretano que tiene un revestimiento antitrombogénico

- 5 La invención se refiere a un poliuretano (PUR) que tiene un revestimiento antitrombogénico, en el que el revestimiento antitrombogénico comprende al menos una sustancia antitrombogénica covalentemente unida a una superficie del PUR.

10 Desde la dirección <http://publica.fraunhofer.de/documents/N-141596.html> se sabe que los policarbonato-uretanos se utilizan en la tecnología médica debido a su bio- y hemocompatibilidad, bioestabilidad, dureza y propiedades de deslizamiento en implantes sometidos a grandes esfuerzos. Un alto grado de capacidad para modificar la superficie permite la aplicación de revestimientos antimicrobianos o antitrombogénicos.

15 Trzaskowski M., *et al.*, *The Challenges of Modern Technology* 2 (1), 2011, páginas 19 a 22 desvelan un revestimiento de hidrogel de polivinilpirrolidona en una superficie de poliuretano para un implante de corazón artificial. La polivinilpirrolidona es un polímero muy hidrófilo que forma hidrogeles en agua. Se espera que aumente la biocompatibilidad del material revestido y evite que la sangre se coagule en la superficie del PUR. Además, se desvela que previamente la hemocompatibilidad se ha mejorado por revestimiento de las superficies de PUR con proteínas que evitan activamente que la sangre se coagule, p. ej., heparina, uroquinasa o trombosmodulina. La durabilidad insuficiente de estas modificaciones se menciona como su principal desventaja.

20 Sask, K. N., *et al.*, *Langmuir* 2012, 28, páginas 2.099 a 2.106 desvelan la modificación de la superficie de poliuretano con un complejo antitrombina-heparina para el contacto de la sangre. Se describe el uso de la química de isocianato para el acoplamiento covalente de óxido de polietileno (OPE) a la superficie del poliuretano. Posteriormente, el complejo antitrombina-heparina se acopla covalentemente al OPE.

25 Un revestimiento covalente de catéteres de poliuretano con un complejo antitrombina-heparina por medio de OPE se conoce a partir de Du, Y. J., *et al.*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, volumen 80 A, Edición 1, 2007, páginas 216 a 225.

30 Del documento US 6.491.965 B1, se conoce un dispositivo médico que comprende conjugados de glicosaminoglicano-antitrombina III/cofactor II de la heparina. Los conjugados se fijan covalentemente a un polímero del dispositivo. El polímero puede ser poliuretano o policarbonato-poliuretano. El dispositivo puede ser un catéter cardíaco, un circuito de derivación cardiopulmonar, un circuito de diálisis o una prótesis *in vivo*.

35 El documento WO 2011/147409 describe un revestimiento de endoprótesis con un revestimiento que consiste en una malla apretada de fibras poliméricas. El polímero puede ser poliuretano. Las endoprótesis pueden comprender una sustancia activa anti-reestenosis, tal como un antitrombótico, p. ej., antitrombina. La sustancia activa puede estar contenida en la malla de fibras poliméricas en forma unida covalentemente, adhesivamente o iónicamente.

40 Del documento WO 03/034944 A1 se conoce un revestimiento de prótesis endovasculares (stents) para la prevención de la reestenosis. El revestimiento puede contener una sustancia activa antitrombótica, tal como antitrombina. La prótesis endovascular (stent) se recubre con un primer revestimiento hemocompatible y al menos un segundo revestimiento que comprende la sustancia activa. El revestimiento hemocompatible puede consistir en heparina, oligo- y polisacáridos, ácido poliacrílico, polivinilpirrolidona y otros polímeros.

45 De la tesis doctoral "*Oberflächenmodifizierung von Polyvinylidenfluorid zur Minimierung der Proteinadsorption*", Ademovic Zahida 2002, Institute of Technology Aachen, ésta es conocida por unir ácido poliacrílico a la superficie de PVDF y por unir polietilenimina (PEI) a los grupos carboxi del ácido poliacrílico por medio del uso de carbodiimida. Posteriormente, aldehídos de polietilenglicol, dextrano carboximetilado o hidroxietil almidón carboximetilado se acoplaron covalentemente a los grupos amino de PEI. El objetivo de este revestimiento era generar un revestimiento superficial que redujese o evitase la unión no específica a proteínas y la adhesión celular resultante. El revestimiento con ácido poliacrílico requiere una incubación a largo plazo a aproximadamente 90 °C. Esto puede resultar en un cambio de las propiedades del sustrato revestido. Una temperatura inferior resulta en un revestimiento ineficaz.

50 Del documento US 4.521.564, se conoce un polímero de poliuretano antitrombogénico. El polímero comprende un sustrato de poliuretano, una amina polimérica covalentemente unida a dicho sustrato de poliuretano y un agente antitrombogénico covalentemente unido a dicha amina polimérica. La amina polimérica puede ser una polietilenimina.

55 Del documento US 5.132.108, se conoce un dispositivo médico que tiene una superficie polimérica biocompatible. Dicha superficie polimérica biocompatible comprende una superficie que ha sido modificada sometiendo la superficie polimérica a un tratamiento con descarga por radiofrecuencia en un medio plasmático que tiene un porcentaje en volumen de vapor de agua entre aproximadamente 40 y aproximadamente 90, el balance de ese medio plasmático tiene un porcentaje en volumen de oxígeno entre aproximadamente 10 y aproximadamente 60 basado en el volumen total de medio plasmático. El tratamiento con plasma es seguido por el tratamiento con un agente de acoplamiento y

- un componente espaciador que tiene grupos amina que forman vínculos covalentes con las superficies poliméricas que se habían sometido a un tratamiento con descarga por radiofrecuencia con dicho medio plasmático, y luego a un tratamiento con un agente antitrombogénico, fibrinolítico o trombolítico que tiene una funcionalidad ácida en contacto y la unión covalente con la superficie polimérica tratada con el componente espaciador. La superficie polimérica puede ser una superficie de poliuretano. La molécula espaciadora que proporciona sitios reactivos para la fijación del agente antitrombogénico puede ser una polietilenimina. Los vínculos covalentes entre los sitios reactivos en la superficie polimérica y los grupos amina de la molécula espaciadora pueden proporcionarse mediante el uso de un agente de acoplamiento adecuado, tal como hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) o dicitclohexilcarbodiimida (DCC). El medio plasmático se proporciona en una cámara. El aire u otro gas se evacua primero desde la cámara de tratamiento por radiofrecuencia hasta que prácticamente no quede en la misma aire u otro gas. A continuación, el vapor de agua se bombea o se inyecta de otro modo a la cámara y un campo eléctrico de radiofrecuencia se genera en la cámara del reactor, induciendo, de este modo, el tratamiento de la superficie polimérica.
- El problema a resolver por la presente invención es proporcionar un material alternativo adecuado para la producción de un dispositivo médico que se inserte temporal o permanentemente en el torrente sanguíneo o en el cuerpo de un mamífero, en particular, de un ser humano. Además, se proporcionará un uso del material médico, un dispositivo médico y un método para producir el material.
- El problema de la presente invención se resuelve mediante la materia objeto de las reivindicaciones 1, 8, 9, 10 y 11. Las realizaciones de la invención se desvelan en las reivindicaciones 2 a 7 y 12 a 15.
- De acuerdo con la invención, se proporciona PUR con un revestimiento antitrombogénico. El revestimiento antitrombogénico comprende al menos una sustancia antitrombogénica covalentemente unida a una superficie del PUR por al menos dos enlaces, en el que uno primero de dichos enlaces es un enlace amida entre la superficie del PUR y una polietilenimina (PEI) y un segundo de dichos enlaces está entre la PEI y la sustancia antitrombogénica. El segundo enlace puede ser también un enlace amida. La superficie del PUR se había activado por el uso de un plasma antes de que se forme el primero de dichos enlaces. El plasma es un plasma de dióxido de carbono o un plasma modificado por adición de dióxido de carbono. La modificación del plasma no sólo resulta en una mayor cantidad de PEI que se une a la superficie de PUR, sino también en un mayor efecto antitrombogénico. El motivo de este efecto es desconocido. Con respecto a la mayor cantidad de PEI unida, se supone que la adición de dióxido de carbono resulta en la formación de grupos carboxi adicionales en la superficie del PUR. Los grupos carboxi pueden utilizarse para la unión covalente de la PEI. Además, se ha descubierto que la combinación de PEI y la sustancia antitrombogénica resulta muy ventajosa. PEI forma un hidrogel cuando entra en contacto con agua o con un fluido corporal. En combinación con la PEI y la sustancia antitrombogénica, el tratamiento con plasma muestra un efecto antitrombogénico positivo y un efecto anti-adhesivo en trombocitos, así como un efecto soporte para la adhesión en células endoteliales.
- El plasma de dióxido de carbono y el plasma modificado por adición de dióxido de carbono puede ser un plasma de baja presión, en particular, un plasma a presión atmosférica, es decir, un plasma en el que la presión coincide o coincide de forma aproximada con la de la atmósfera circundante. Puede generarse por medio de una descarga de alta tensión a una frecuencia de 10 a 250 kHz. El plasma a modificar mediante la adición de dióxido de carbono puede ser un plasma de nitrógeno (plasma de N₂) o un plasma de argón.
- El PUR, de acuerdo con la invención, supera los problemas de la formación de trombos causados por los dispositivos médicos que se implantan. Se ha descubierto que es muy eficaz en la inhibición del desencadenamiento de la coagulación sanguínea, la adhesión de los trombocitos y la activación de los trombocitos y leucocitos. Además, se ha descubierto que inhibe la colonización con bacterias y la formación resultante de biopelículas en los dispositivos médicos que se implantan. La formación de biopelículas, en particular, causada por la colonización por *Staphylococcus epidermidis*, es una causa principal de infecciones crónicas asociadas al uso de implantes. Dado que estas infecciones crónicas no pueden ser tratadas con éxito con antibióticos, en la mayoría de los casos existe una urgente necesidad de superficies de implantes que impidan o inhiban la formación de biopelículas. El PUR, de acuerdo con la invención, es muy eficaz en la inhibición de la adhesión de bacterias, el crecimiento de bacterias y la formación de biopelículas.
- El PUR puede ser un elastómero de PUR. Los elastómeros de PUR son copolímeros en bloque de múltiples fases que consisten en bloques de segmentos "duros" y "blandos" alternos y por tanto se hace referencia como polímeros segmentados. En particular, el PUR puede ser un PUR a base de policarbonato elastomérico. Un PUR de este tipo puede sintetizarse a partir de poliol policarbonato, diisocianato de metileno, etilendiamina, y diaminociclohexano. El poliol policarbonato puede ser glicol policarbonato. El PUR puede sintetizarse en dimetilacetamida (DMAC) como disolvente. DMAC también puede utilizarse para disolver el PUR para darle la forma que se desee. El PUR elastomérico puede adquirirse en AdvanSource Biomaterials, 229 Andover Street, Wilmington, MA 01887, EE. UU. bajo los nombres ChronoFlex AR[®], ChronoFlex AR-LT[®], ChronoFlex C[®] o ChronoSil[®]. También se puede adquirir en The Lubrizol Corporation, 29400 Lakeland Boulevard, Wickliffe, Ohio 44092, EE. UU., bajo el nombre Carbothane[®] TPU o en DSM Biomedical B.V., Koestraat 1, 6167 RA Geleen, Holanda, bajo los nombres Carbosil[®] TSPCU, BioSpan[®] SPU, Bionate[®] PCU y Elasthane[™] TPU. Un PUR adicional que puede utilizarse es Vasomer[®] de B. Braun

Melungen AG.

En una realización, la PEI está ramificada o es un dendrímero. En este caso, el número de enlaces, en particular enlaces amida, mediante los cuales la sustancia antitrombogénica puede unirse y con ello el efecto antitrombogénico puede aumentarse enormemente.

La sustancia antitrombogénica puede ser heparina modificada para comprender un grupo reactivo en estado no unido o antitrombina III (AT III) o cualquier otra sustancia antitrombogénica que tiene al menos un grupo carboxi, un grupo cetona, un grupo aldehído o un grupo amino en estado no unido. El grupo reactivo de la heparina modificada puede ser un grupo carboxi, un grupo cetona, un grupo aldehído o un grupo amino. La heparina puede modificarse por reacción con NaNO_2/HCl . En esta reacción, la molécula de heparina se acorta y se forma un grupo aldehído. Esta molécula de heparina modificada puede unirse por medio del grupo aldehído a un grupo amino de la PEI por aminación reductora por medio de NaBH_3CN . Si la sustancia antitrombogénica comprende un grupo amino, la unión a un grupo amino de la PEI puede lograrse por un acoplamiento por medio de glutardialdehído. El experto en la materia conoce otros métodos y mecanismos para acoplar los grupos reactivos mencionados a un grupo amino de la PEI. En combinación con PEI, heparina, así como AT III son muy eficaces en la inhibición de la formación de trombos.

La invención también se refiere a un PUR, de acuerdo con la invención, para su uso como un medicamento.

La invención también se refiere a un PUR, de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento de la trombosis o de un riesgo de desarrollar trombosis. El PUR, de acuerdo con la invención, puede inhibir la formación de trombos y el desencadenamiento de la coagulación sanguínea. También puede inhibir la adhesión de los trombocitos y la activación de los trombocitos y leucocitos.

La invención también se refiere a un dispositivo médico que se inserta o se pone en contacto temporal o permanentemente en o con un torrente sanguíneo o que se inserta temporal o permanentemente en un cuerpo de un mamífero o de un ser humano, en el que una superficie de dicho dispositivo médico comprende el PUR de acuerdo con la invención. El dispositivo médico puede ser un catéter, un tubo para el flujo a través de la sangre, una válvula cardíaca artificial, un corazón artificial, o un sustituto de un hueso o una articulación o una parte de un hueso o de una articulación.

La invención también se refiere a un método para producir PUR de acuerdo con la invención que comprende las siguientes etapas:

a) activación de la superficie de PUR,

b) primer acoplamiento, en el que la PEI se acopla a la superficie de PUR, y

c) segundo acoplamiento, en el que la sustancia antitrombogénica se acopla a la PEI.

El primer acoplamiento y/o el segundo acoplamiento puede ser en cada caso un acoplamiento mediado por carbodiimida. El acoplamiento mediado por carbodiimida requiere en cada caso la presencia de un grupo amino y un grupo carboxi. En el caso del primer acoplamiento y del segundo acoplamiento, el grupo amino se proporciona por la PEI. La activación de la superficie comprende la formación de radicales en la superficie del PUR seguido de la formación de grupos carboxi. Esto puede ocurrir por reacción con O_2 o CO_2 presente en el aire. El método permite un acoplamiento covalente de sustancias a PUR sin la desventaja de exponerse a una temperatura relativamente alta según procediera para un acoplamiento eficaz de ácido poliácrico.

La activación se realiza mediante el uso de un plasma, es decir, un gas ionizado. El plasma puede ser un plasma frío. Un plasma frío es un plasma en el cual sólo se ioniza una pequeña fracción de las moléculas de gas.

Se ha demostrado que la activación de la superficie de PUR es suficiente para generar grupos carboxi suficientes en la superficie a la que PEI puede unirse covalentemente por medio de enlaces amida. El plasma puede ser un plasma de dióxido de carbono, un plasma de nitrógeno o un plasma de argón. Si el plasma no es un plasma de dióxido de carbono, se modifica por adición de dióxido de carbono. El dióxido de carbono puede añadirse simplemente por adición de aire o por adición de dióxido de carbono de calidad pura o médica. La modificación del plasma aumenta la cantidad de PEI que puede unirse a la superficie de PUR. Se supone que la adición de dióxido de carbono resulta en la formación de grupos carboxi adicionales en la superficie del PUR. Los grupos carboxi pueden utilizarse para la unión covalente de la PEI. Además, se ha descubierto que la modificación del plasma aumenta el efecto antitrombogénico del PUR de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una realización adicional del método, la superficie de PUR se expone al aire o al oxígeno entre las etapas a) y b). Esta exposición permite la unión covalente adicional a la superficie de PUR. Se supone que el efecto de esta incubación es que se generen hidróperóxidos en la superficie del PUR.

La superficie de PUR puede incubarse en agua, un tampón, o una solución salina, en particular, una solución salina isotónica, entre las etapas a) y b). En caso de que la superficie de PUR se exponga al aire o al oxígeno entre las etapas a) y b), la superficie de PUR se incubaba en el agua, en el tampón, en la solución salina, o en la solución salina isotónica entre las etapas a) y b) y tras la exposición al aire o al oxígeno. Por esta incubación, la superficie de PUR cambia y se hincha el PUR. El PUR se vuelve turbio en una etapa posterior de lavado en agua desionizada. La superficie modificada permite una mayor unión de la PEI. La incubación puede realizarse a temperatura ambiente, pero el efecto se potencia si la temperatura se eleva ligeramente, p. ej., a aproximadamente 50 °C.

Para aumentar la cantidad de PEI unida covalentemente, la etapa b) puede realizarse al menos dos veces.

El primer y/o el segundo acoplamiento pueden realizarse mediante el uso de H-hidroxisuccinimida (NHS) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). La EDC puede obtenerse y aplicarse como hidrocloreto de EDC. Se ha demostrado que este acoplamiento mediado por carbodiimida es muy eficaz. Los inventores descubrieron que el PUR puede secarse después de la etapa c), en particular, después del enjuague con agua desmineralizada. Después de volver a humedecer el PUR seco, aún tiene una muy buena actividad antitrombogénica y evita la adhesión de proteínas y células. El secado facilita la manipulación, el almacenamiento y la distribución del PUR de acuerdo con la invención.

Realizaciones de la invención:

La Fig. 1 muestra una presentación esquemática del acoplamiento mediado de polietilenimina por carbodiimida.

La Fig. 2 muestra una fórmula de PEI ramificada.

La Fig. 3 muestra una gráfica de la adhesión de *Staphylococcus epidermidis* (STEP) en PUR y PUR-PEI-AT III.

La Fig. 4 muestra una gráfica de la proliferación de STEP después de 8 horas de incubación en PUR y PUR-PEI-AT III.

La Fig. 5 muestra una gráfica de la proliferación de STEP después de 120 horas de incubación en PUR y PUR-PEI-AT III.

La Fig. 6 muestra una gráfica de la formación de coágulos inducida por PUR y cuatro cargas de PUR-PEI-AT III.

La Fig. 7 muestra una gráfica de la unión de trombocitos a PUR y PUR con varios revestimientos.

La Fig. 8 muestra fotomicrografías de superficies de PUR y PUR-PEI-AT III después de la incubación con los trombocitos en suspensión, el lavado y la tinción con rodamina-faloidina de la adhesión de trombocitos.

La Fig. 9 muestra una gráfica de la activación de trombocitos antes y después de 90 minutos de contacto con PUR y PUR-PEI-AT III.

La Fig. 10 muestra una gráfica del contenido de trombina de sangre entera antes y después de 90 minutos de contacto con PUR y PUR-PEI-AT III.

La Fig. 11 muestra una gráfica de la activación de los leucocitos en sangre entera antes y después de 90 minutos de contacto con PUR y PUR-PEI-AT III.

La Fig. 12 muestra una gráfica de la formación de trombos inducida por PUR-AT III, en la que el PUR se trató con diferentes plasmas antes de la unión de AT III.

Para producir el PUR, de acuerdo con la invención, ChronoFlex AR[®] adquirido en AdvanSource Biomaterials se utilizó para producir pequeños discos de PUR. Los discos se lavaron durante 10 minutos en etanol puro o isopropanol y después se secaron durante al menos 24 horas a temperatura ambiente. Más tarde, los discos se activaron mediante el uso de un plasma de nitrógeno frío generado a 4,5 kV con un flujo de gas de 20 NI (litros normales) por minuto al cual se añadió dióxido de carbono de calidad médica con un flujo de gas de 1,5 a 2,0 NI/min. El haz de plasma se mueve con una velocidad de 5 cm/min sobre la superficie de PUR. Después del tratamiento con plasma, los discos se expusieron al aire durante 45 minutos a temperatura ambiente. Más tarde, los discos se incubaron durante dos horas a 50 °C en una solución salina isotónica. Durante este tratamiento, las superficies de los discos cambiaron. Los discos activados con plasma se volvieron turbios en una etapa posterior de lavado en agua desionizada mientras que los discos no activados permanecieron limpios durante el mismo procedimiento.

Tras enjuagar los discos con agua desionizada, el PUR se incubó durante 20 minutos en 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0,1 M y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) 0,1 M en agua. Más tarde, los discos se enjuagaron con agua desmineralizada otra vez e inmediatamente se incubaron con polietilenimina ramificada al 0,3 % en tampón carbonato durante dos horas a 50 °C. Durante este procedimiento, la polietilenimina se unió covalentemente por medio de un grupo amino a un grupo -COOH del PUR. La reacción se muestra esquemáticamente en la Fig. 1. La Fig. 2 muestra una fórmula de la polietilenimina (PEI) ramificada. El producto resultante PUR-PEI se enjuagó con agua desmineralizada. 4 UI/ml de antitrombina III se activaron durante 20 minutos con EDC 0,2 M y NHS 0,1 M en una solución acuosa. Más tarde, se añadieron tres partes de tampón carbonato a una parte de esta solución. El PUR-PEI se incubó en la solución resultante durante al menos 19 horas a 4 °C. Al final de la reacción, los discos resultantes de PUR-PEI-AT III se enjuagaron con agua desmineralizada y se secaron a 4 °C.

La primera etapa de formación de biopelículas es la adhesión de bacterias en la superficie de un material y la proliferación de las bacterias. *Staphylococcus epidermidis* es una bacteria que puede formar biopelículas. PUR-PEI-AT III y PUR se ensayaron con respecto a la adhesión y a la proliferación de *Staphylococcus epidermidis* (STEP). Para este fin, los discos de PUR y PUR-PEI-AT III se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en una suspensión de bacterias. Más tarde, los discos se lavaron cinco veces. Entonces la cara de los discos que se expuso a las bacterias se colocó en una placa de agar sangre y se mantuvo en el agar sangre. Más tarde, el agar sangre se incubó durante la noche a 37 °C. Después se retiraron los discos. En las posiciones en las que se aplicaron bacterias a agar sangre, éstas comenzaron a proliferar y a formar cavidades en el agar sangre que podrían contarse como unidades formadoras de colonias para cuantificar el número de bacterias que se adhirieron en los discos. La relación resultante de bacterias adheridas en PUR a las bacterias que se adhieren a PUR-PEI-AT III se muestra en la Fig. 3. En el experimento, se examinaron dos cargas diferentes de PUR y PUR-PEI-AT en dos ensayos independientes, cuatro veces cada uno. Esto demuestra que la adhesión de STEP a PUR-PEI-AT III se reduce en aproximadamente el 80 % con respecto a la adhesión a PUR.

Para examinar la proliferación de bacterias, las bacterias se cultivaron en discos de PUR y PUR-PEI-AT III durante 8 horas y 120 horas a 37 °C. Más tarde, las bacterias se fijaron mediante el uso de metanol puro y se tiñeron con cristal violeta al 0,2 %. Después de varias etapas de lavado, el cristal violeta se disolvió de las bacterias por el uso de etanol. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 595 nm. Los resultados se muestran en las Figs. 4 y 5. En las primeras etapas de la proliferación, pocas bacterias se separaron de los discos. En etapas posteriores de la formación de biopelículas, porciones de la biopelícula se separaron de los discos. En ambos experimentos, se ensayaron dos cargas diferentes de PUR y PUR-PEI-AT III en ensayos independientes (tres veces cada uno).

Los resultados demuestran que PUR-PEI-AT III en contraste con PUR no permite una proliferación significativa de STEP.

En un experimento adicional, discos de PUR y PUR-PEI-AT III se incubaron con sangre con EDTA (reactivada mediante el uso de CaCl₂) durante dos días. Durante este tiempo, un trombo podría formarse en la superficie de los discos. Después de los dos días, los discos se retiraron de la sangre, se lavaron a fondo y se pesaron. Los resultados obtenidos con PUR y las cuatro cargas diferentes de PUR-PEI-AT III se muestran en la Fig. 6. El valor obtenido para PUR se establece en 1,0 y los otros valores se dan en relación a este valor. Los resultados muestran una reducción del 40 % de la formación de coagulado tras el contacto con PUR-PEI-AT III en comparación con PUR.

En un ensayo adicional, se examinó la adhesión de trombocitos. Para este fin, los discos de PUR no revestidos o discos PUR revestidos con PEI, PEI-heparina K (PEI-HepK), AT III y PEI-AT III se incubaron en una suspensión de trombocitos a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 60 minutos. Más tarde, se fijaron los trombocitos adherentes, se permeabilizaron y se tiñeron con rodamina-faloidina. Los resultados se determinaron por microscopía de fluorescencia y puntuación. Se examinaron los trombocitos de cinco donantes diferentes. Los resultados se muestran en la Fig. 7. Cuatro campos de visión seleccionados arbitrariamente por disco se analizaron en tres personas independientes. La puntuación 1 significa que menos del 20 % de la superficie estaba revestida con trombocitos. La puntuación 2 significa que del 20 % al 50 % de la superficie estaba revestida con trombocitos y la puntuación 3 significa que más del 50 % de la superficie estaba revestida con trombocitos.

La Fig. 8 muestra en el panel izquierdo cuatro campos de visión de discos PUR-PEI-AT III y en el panel derecho cuatro campos de visión de discos PUR después de la adhesión de trombocitos y la tinción con rodamina-faloidina.

Los resultados muestran que PUR-PEI-AT III es repulsivo para los trombocitos. Los resultados de la Fig. 7 también muestran que el efecto no es sólo un efecto de PEI y no sólo un efecto de AT III sino un efecto sinérgico de la combinación de PEI y AT III.

En un enfoque dinámico, los tubos revestidos con PUR-PEI-AT III en su superficie interior se llenaron con sangre heparinizada de cinco donantes diferentes. Los tubos se hicieron girar y con ello la sangre se expuso a fuerzas de cizallamiento definidas. Los resultados se compararon con los resultados obtenidos con sangre heparinizada sin tratar. La superficie interior de los tubos se examinó mediante el uso de microscopía electrónica. Los experimentos

mostraron que muchos menos trombocitos se adhirieron a tubos revestidos con PUR-PEI-AT III que a tubos de PUR no revestidos. En este enfoque, se ha determinado la activación de trombocitos mediante la medición de β -tromboglobulina (β -TG) liberada. La β -tromboglobulina se almacena en los trombocitos y se libera después de la activación. Los resultados se muestran en la Fig. 9. La Fig. 9 muestra la liberación de β -tromboglobulina antes (control) y después de 90 minutos de contacto con los tubos (PUR) no revestidos o tubos (PUR-PEI-AT III) revestidos en el enfoque dinámico. Cada valor se ha determinado cinco veces. La Fig. 9 muestra que los trombocitos se activaron mucho menos por PUR-PEI-AT III en comparación con PUR.

En un ensayo adicional, la extensión de la formación de trombina se examina mediante la determinación de la concentración de trombina en sangre entera antes (control) y después de 90 minutos de incubación en el enfoque dinámico por medio de la medición de la formación del complejo trombina-antitrombina III (TAT). Los resultados de cinco mediciones independientes se muestran en la Fig. 10. Esto muestra que PUR-PEI-AT III inhibe significativamente la formación de trombina y con ello la formación de trombos en comparación con PUR.

En un experimento adicional, se examinó la activación de leucocitos. La PMN-elastasa presente en los granulocitos neutrófilos se libera durante la inflamación. La liberación de PMN-elastasa muestra la activación de leucocitos. La concentración de PMN-elastasa se determinó en sangre entera antes (control) y después de 90 minutos de incubación en el enfoque dinámico en cinco determinaciones independientes. Los resultados se muestran en la Fig. 11. Esto demuestra que PUR-PEI-AT III inhibe significativamente la activación de leucocitos en este enfoque dinámico en comparación con PUR.

Otro ensayo se realizó para comparar el efecto de los diferentes plasmas en la formación de trombos. Para este fin, PUR se preparó como se ha descrito anteriormente. No obstante, el PUR o bien no se activó con un plasma (en el caso de "control" y "sin plasma" de acuerdo con la Fig. 12) o bien se activó con un plasma de argón, un plasma de N_2 o con un plasma de N_2 modificado con CO_2 . El plasma de argón era un plasma de argón frío generado a 4,5 kV con un flujo de gas de 10 NI por minuto. El plasma de nitrógeno era un plasma de nitrógeno frío generado a 4,5 kV con un flujo de gas de 20 NI por minuto. En el caso de plasma de N_2 modificado, el dióxido de carbono de calidad médica se añadió al flujo de gas de nitrógeno de 20 NI por minuto con un flujo de gas de 1,7 NI por minuto. En cada caso de tratamiento con plasma, el haz de plasma se mueve con una velocidad de 5 cm/min sobre la superficie de PUR. En todos los casos, excepto en el caso "sin plasma y sin NaCl", los discos se incubaron durante dos horas a 50 °C en una solución salina isotónica. Después de enjuagar los discos con agua desionizada, el PUR se incubó durante 20 minutos en EDC 0,1 M y NHS 0,1 M en agua. Más tarde, los discos se enjuagaron con agua desmineralizada otra vez e inmediatamente se incubaron con 1 UI/ml de antitrombina III en tampón carbonato 0,1 M, pH 8,4 durante la noche a 4 °C. Más tarde, los discos se enjuagaron con agua desmineralizada y se secaron a 4 °C.

En caso de un control, el único tratamiento de los discos consistió en el lavado de los discos durante 10 minutos en etanol puro y secado de los discos en aire a temperatura ambiente.

Para el ensayo, los discos se incubaron con sangre con EDTA (reactivada mediante el uso de $CaCl_2$) durante dos días. Durante este tiempo, un trombo podría formarse en la superficie de los discos. Después de los dos días, los discos se retiraron de la sangre, se lavaron a fondo y se pesaron. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 12. Los resultados muestran que la modificación de plasma de N_2 por adición de CO_2 tiene un efecto antitrombogénico positivo en el PUR.

Conjuntamente, todos estos datos muestran que el PUR, de acuerdo con la invención, tiene un efecto antitrombogénico distintivo y características ventajosas.

REIVINDICACIONES

1. Poliuretano (PUR) que tiene un revestimiento antitrombogénico, en donde el revestimiento antitrombogénico comprende al menos una sustancia antitrombogénica covalentemente unida a una superficie del PUR mediante al menos dos enlaces, en donde un primero de dichos enlaces es un enlace amida entre la superficie del PUR y una polietilenimina (PEI) y un segundo de dichos enlaces está entre la PEI y la sustancia antitrombogénica, en donde la superficie del PUR se ha activado mediante el uso de un plasma de dióxido de carbono o un plasma modificado por adición de dióxido de carbono antes de que se forme el primero de dichos enlaces.
2. PUR según la reivindicación 1, en donde el PUR es un PUR elastomérico o un PUR a base de policarbonato elastomérico.
3. PUR según la reivindicación 2, en donde el PUR se sintetiza a partir de glicol policarbonato, diisocianato de metileno, etilendiamina y diaminociclohexano.
4. PUR según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la PEI es ramificada o es un dendrímero.
5. PUR según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo enlace es un enlace amida.
6. PUR según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia antitrombogénica es heparina modificada para comprender un grupo reactivo en estado no unido o antitrombina III (AT III) o cualquier otra sustancia antitrombogénica que tiene al menos un grupo carboxi, un grupo cetona, un grupo aldehído o un grupo amino en estado no unido.
7. PUR según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el plasma modificado es un plasma de nitrógeno o un plasma de argón.
8. PUR según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso como un medicamento.
9. PUR según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de la trombosis o de un riesgo de desarrollar trombosis.
10. Dispositivo médico que se inserta o se pone en contacto temporal o permanentemente en o con un torrente sanguíneo o que se inserta temporal o permanentemente en un cuerpo de un mamífero o de un ser humano, en donde una superficie de dicho dispositivo médico comprende el PUR según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Método de producción del PUR según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende las siguientes etapas:
 - a) activación de la superficie de PUR, en donde la activación se realiza mediante el uso de un plasma, en donde el plasma es un plasma de dióxido de carbono o el plasma se modifica por adición de dióxido de carbono,
 - b) primer acoplamiento, en el que la PEI se acopla a la superficie de PUR, y
 - c) segundo acoplamiento, en el que la sustancia antitrombogénica se acopla a la PEI.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la superficie de PUR se expone al aire o a oxígeno entre las etapas a) y b).
13. Método según las reivindicaciones 11 o 12, en el que la superficie de PUR se incuba en agua, un tampón, una solución salina o una solución salina isotónica entre las etapas a) y b) y, en el caso en el que la superficie de PUR se expone al aire o a oxígeno entre las etapas a) y b), después de la exposición al aire o a oxígeno.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el primer y/o el segundo acoplamiento se realizan mediante el uso de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC).
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el plasma modificado es un plasma de nitrógeno o un plasma de argón.

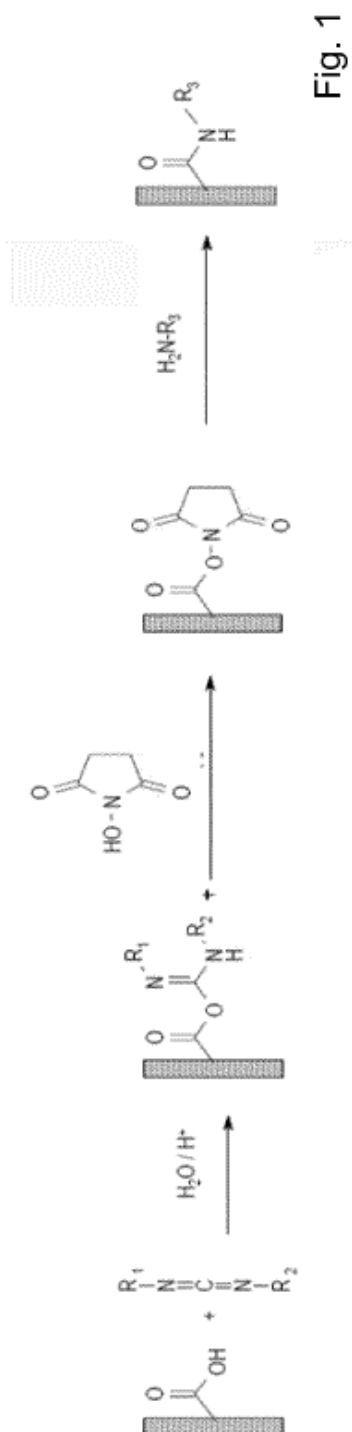


Fig. 1

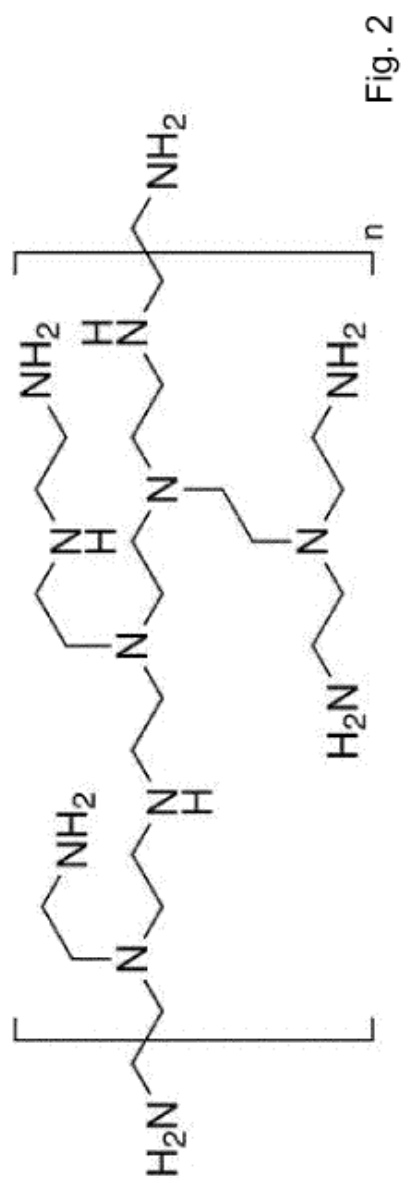


Fig. 2

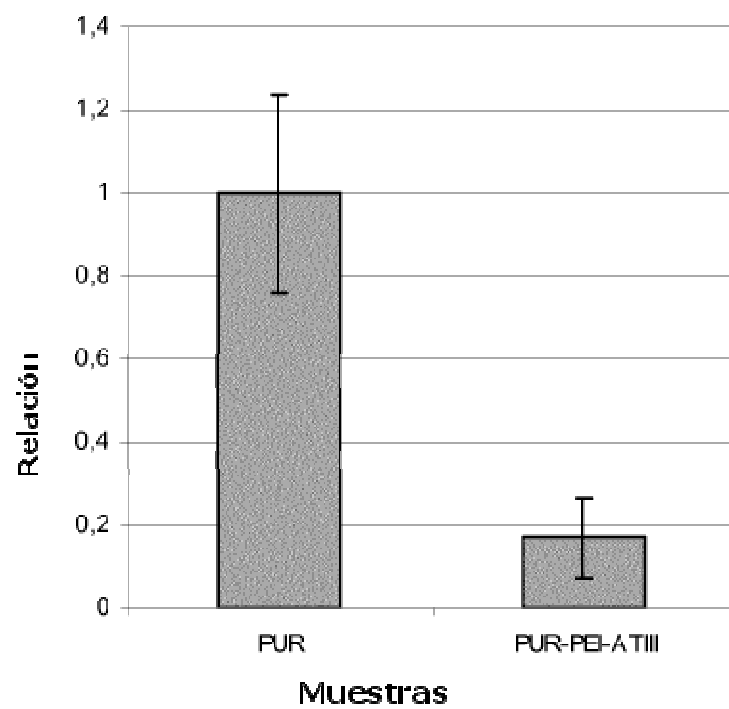


Fig. 3

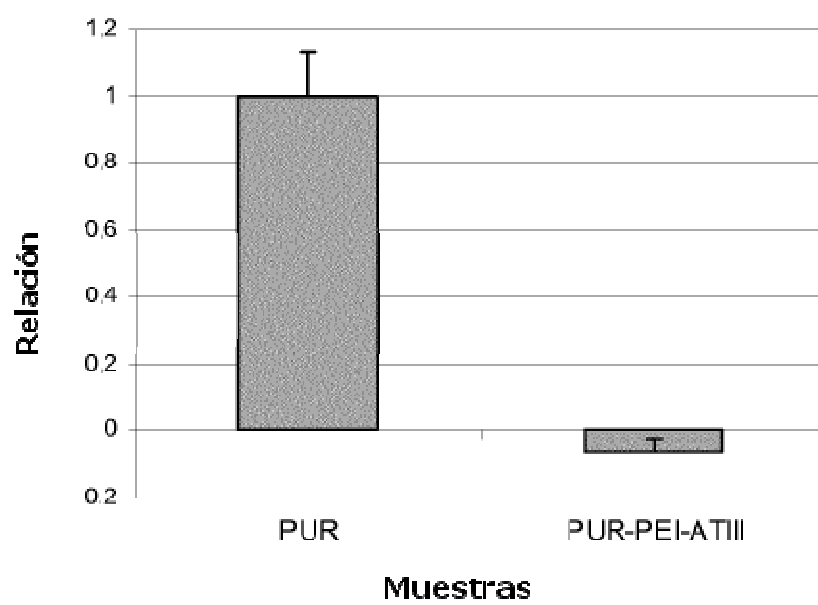


Fig. 4

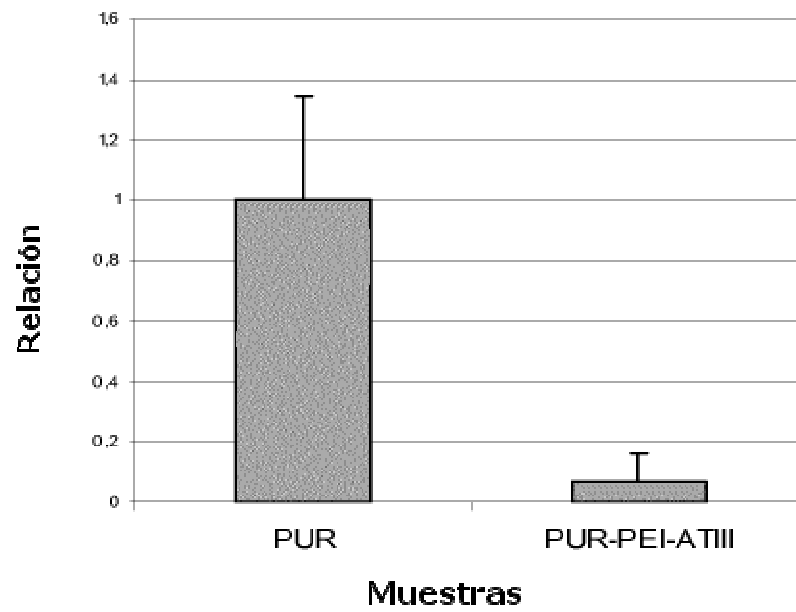


Fig. 5

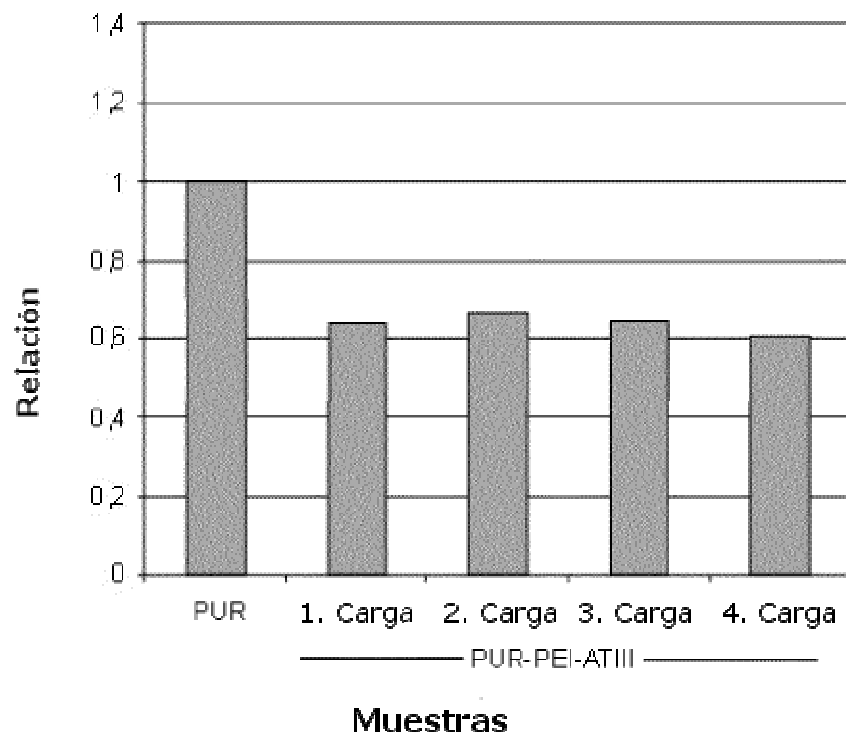


Fig. 6

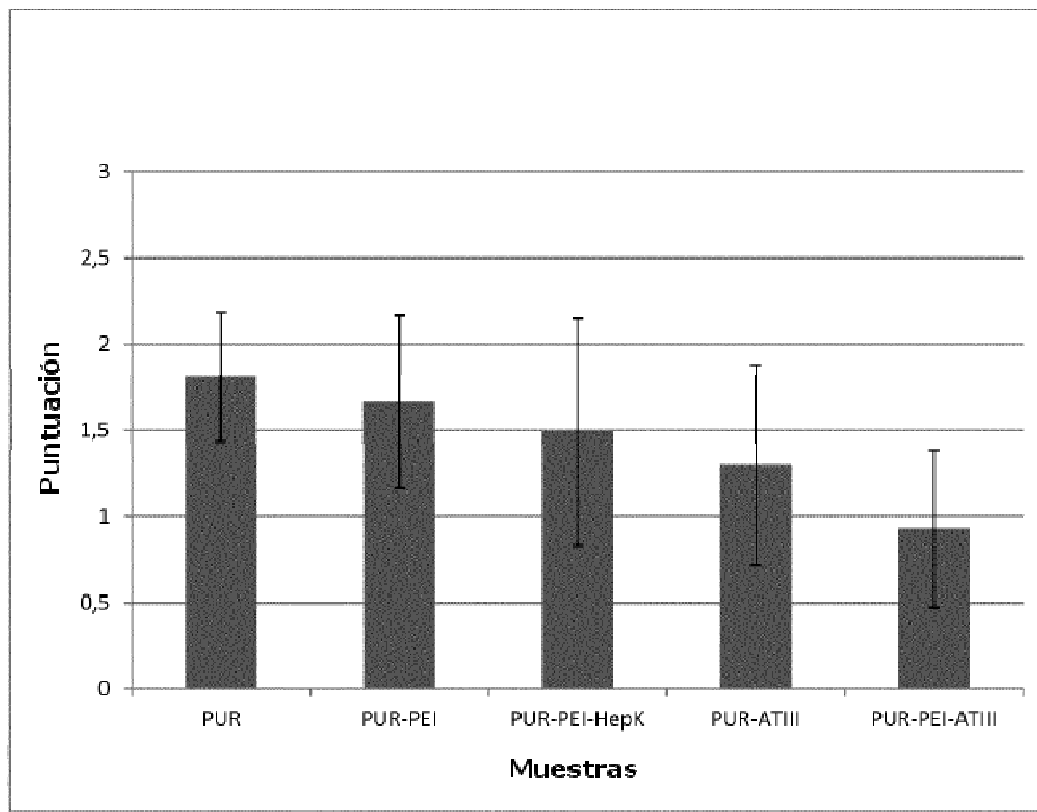


Fig. 7

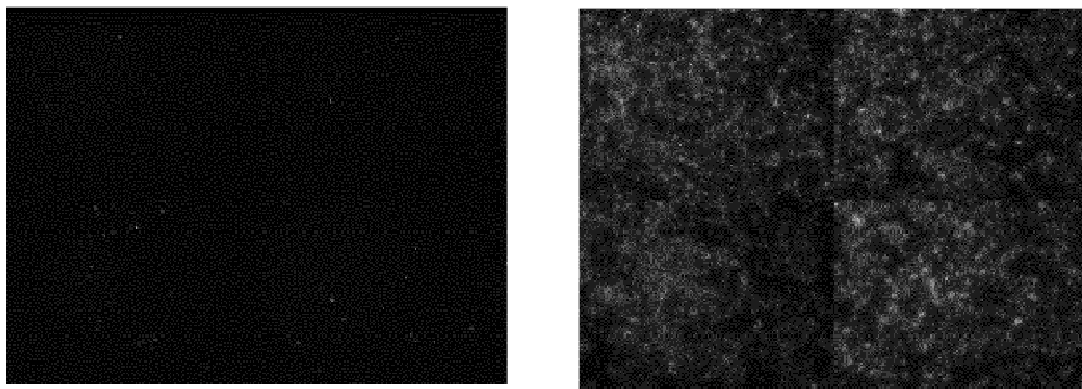


Fig. 8

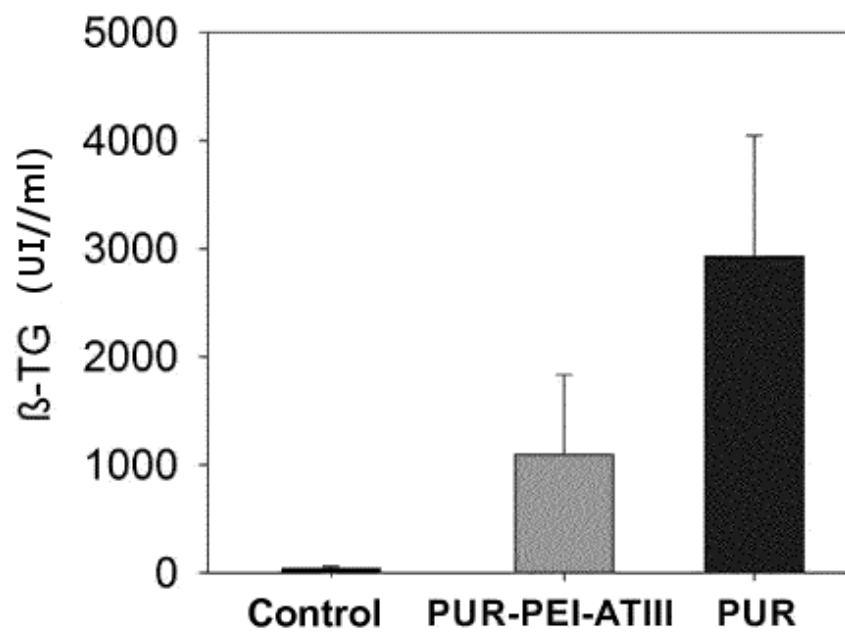


Fig. 9

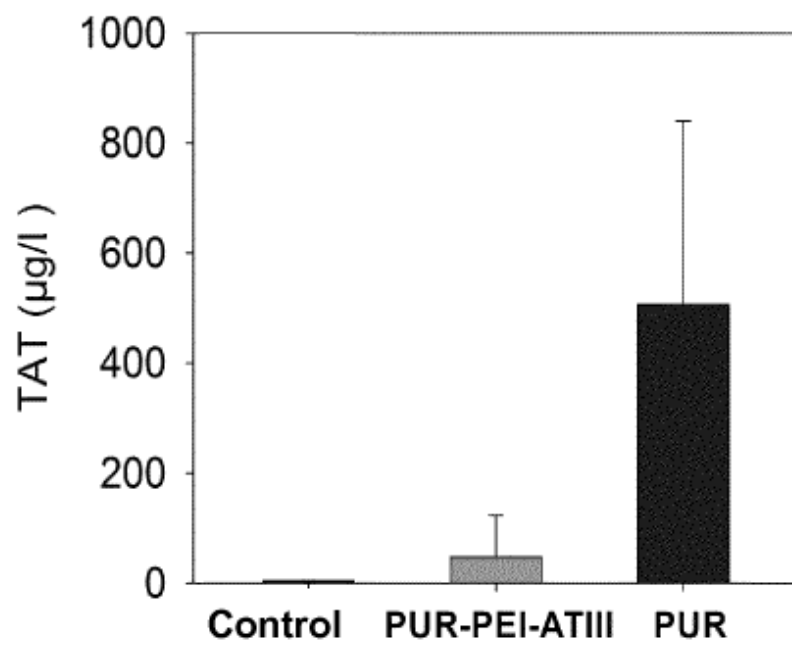


Fig. 10

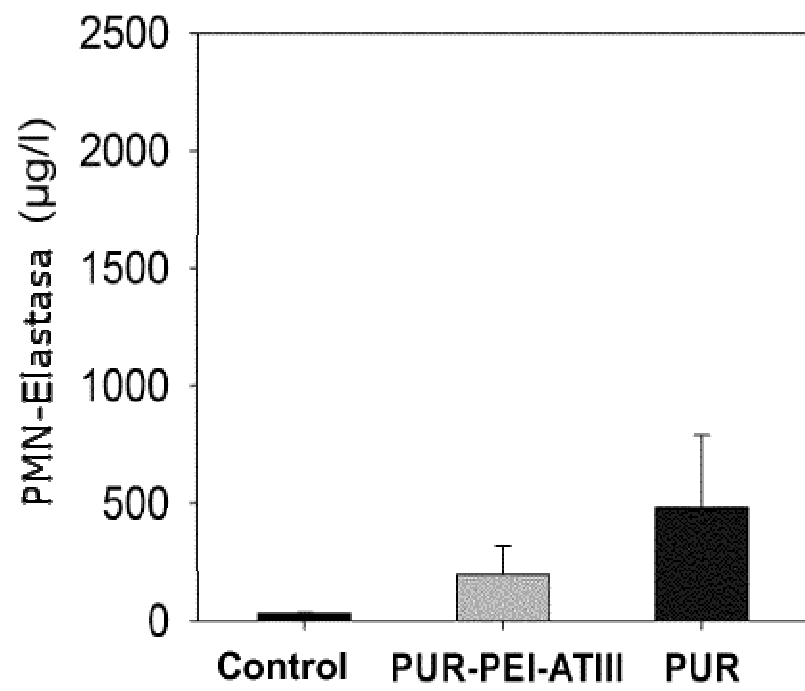


Fig. 11

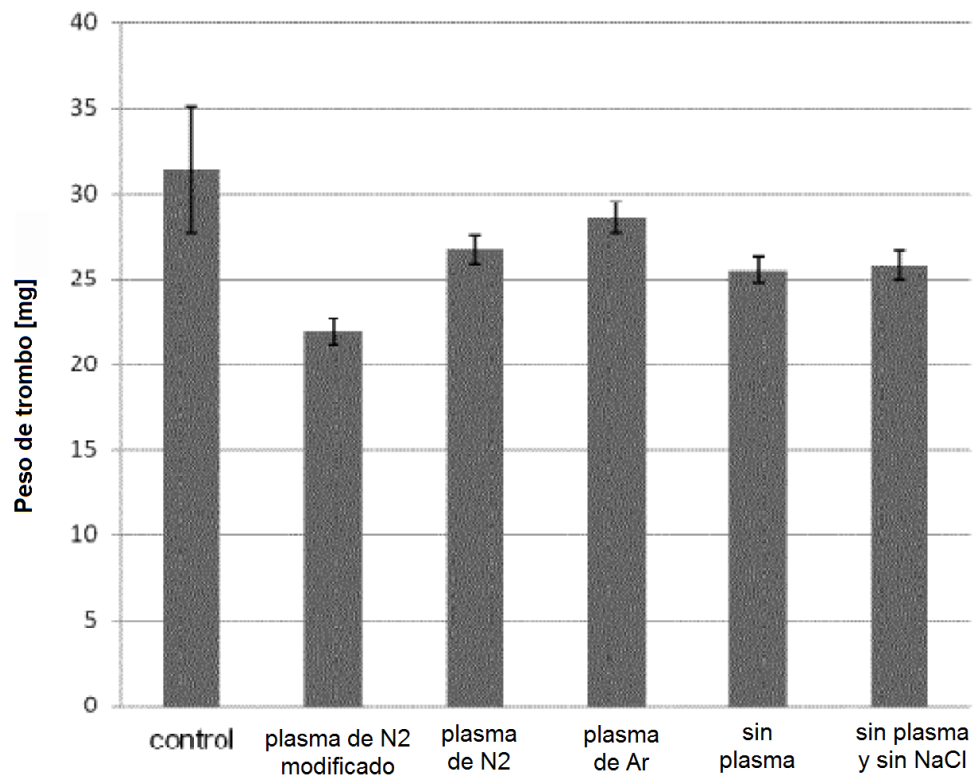


Fig. 12