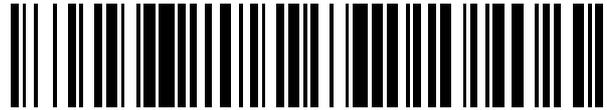


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 369**

51 Int. Cl.:

**A61L 33/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2011 PCT/EP2011/053745**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11110684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2011 E 11708813 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2544728**

54 Título: **Entidades biológicas inmovilizadas**

30 Prioridad:

**12.03.2010 GB 201004101**

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

**28.11.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VESTBERG, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 644 369 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Entidades biológicas inmovilizadas

Esta invención se refiere a entidades biológicas inmovilizadas, superficies y objetos sólidos, por ejemplo, productos sanitarios, recubiertos con dichas entidades y procedimientos y compuestos intermedios para su producción.

5 **Antecedentes de la invención**

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

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

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

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

30 La heparina es un polisacárido que soporta grupos sulfato y ácido carboxílico con carga negativa en las unidades sacáridas. Se intentó así la unión iónica de la heparina a superficies policatiónicas, pero estas modificaciones superficiales adolecían de falta de estabilidad dando como resultado falta de función, ya que la heparina se lixivaba de la superficie.

Después, se han preparado diferentes modificaciones superficiales en las que la heparina se ha unido mediante enlaces covalentes a grupos en la superficie.

35 Uno de los procedimientos más exitosos para hacer no trombogénico un producto sanitario ha sido la unión covalente de un fragmento de heparina a una superficie modificada del dispositivo. El método general y sus mejoras se describen en las patentes europeas: EP-B-0 086 186, EP-B-0 086 187, EP-B-0 495 820 y la patente de EE. UU. 6 461 665.

40 Estas patentes describen la preparación de sustratos superficialmente modificados mediante, primero, una escisión selectiva de la cadena polisacárida de heparina, por ejemplo, usando la degradación de ácido nitroso, que conduce a la formación de grupos aldehído terminales. Segundo, la introducción de una o más capas modificadoras de la superficie que soportan grupos amino primarios en la superficie del producto sanitario y reacción después de los grupos aldehído en la cadena de polisacárido con los grupos amino en las capas modificadoras de la superficie seguido por una reducción de las bases de Schiff intermedias para formar enlaces amino secundario, estables.

45 La patente alemana DE 19 604 173 se refiere a productos sanitarios con una superficie polimérica basada en un monómero de bisfenilo sustituido al que puede unirse un agente farmacéuticamente activo tal como heparina.

La patente internacional WO 2008/090 555 se refiere a un producto sanitario recubierto con una matriz polimérica que incorpora un agente farmacéuticamente activo. Parece que el agente activo puede incorporarse en la matriz polimérica.

50 La patente de EE. UU. 2005/0 059 068 se refiere a una superficie químicamente activa capaz de reaccionar mediante enlaces covalentes con sustancias que contienen un grupo hidroxilo y/o un grupo amino, que comprende una superficie sólida con una poliamina dendrímica activada unida mediante enlaces covalentes a dicha superficie por un reactivo que contiene silano, en la que la poliamina dendrímica puede unirse mediante enlaces covalentes a la sustancia que comprende un grupo hidroxilo y/o un grupo amino.

Allyson Kaye Fry: "Synthesis and Anticoagulant function of Heparin Containing Block Copolymers on Polystyrene microspheres" es una tesis que describe un estudio con la finalidad de sintetizar una heparina tiolada que podía estar unida "en el extremo" a cadenas de poli(óxido de etileno) (POE) activadas con disulfuro de piridilo superficialmente inmovilizadas y evaluar la retención de actividad anticoagulante en la forma inmovilizada.

5 La patente de EE. UU. 2005/266 038 (Glauser et al.) describe un producto sanitario que comprende un recubrimiento en el mismo que comprende un polímero biocompatible y heparina. Se dice que la heparina está acoplada al polímero biocompatible mediante un espaciador con una agrupación que hace accesible un sitio de unión de la molécula de heparina mediante una proteína de unión.

10 Joseph D. Bronzino: "The Biomedical Engineering Handbook", vol. II 2000, CRC Press ISBN: 3-540-66808-X ilustra la inmovilización para tioles de superficie.

La patente de EE. UU. 2008/089 919 (Gore Enterprise Holdings, Inc.) describe la inmovilización de entidades biológicamente activas con actividad de unión de cofactor II de la heparina.

15 Qi Peng et al.: "'Disulfide Cross-Linked Polyethyleneimines (PEI) Prepared via Thiolation of Low Molecular Weight PEI as Highly Efficient Gene Vectors" Bioconjugate Chem. 2008, 19, págs. 499-506 describen una reacción de apertura de anillo de polietilenimina de bajo peso molecular con un  $M_p$  de 800 Da (PEI de 800 Da) con metiltiirano para producir polietilenimina tiolada (PEI-SH<sub>x</sub>).

Loussouarn et al.: "Molecular Basis of Inward Rectification: Structural Features of the Blocker Defined by Extended Polyamine Analogs" Molecular Pharmacology, 2005, 68, págs. 298-304 investigan las restricciones estructurales del bloque de poliamina de canales de K<sub>ATP</sub> mutantes fuertemente rectificantes.

20 Sin embargo, hay aún el requisito de que las modificaciones superficiales puedan realizarse en condiciones suaves (por ejemplo, que no se degrade la heparina) que son más fáciles de manipular, son más simples y más eficaces de producir y/o donde es mayor la biodisponibilidad del resto de heparina.

25 La solicitud de patente internacional WO 2010/029 189 anterior se refiere a un producto sanitario con un recubrimiento con una molécula anticoagulante tal como heparina unida mediante enlaces covalentes al recubrimiento por una unión de 1,2,3-triazol. El documento describe la funcionalización con azida o alquino de una poliamina; la preparación de heparina con funciones alquino o azida (heparina tanto natural como degradada con ácido nítrico) y la reacción para unir la heparina derivatizada al polímero derivatizado mediante un ligador de 1,2,3-triazol.

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

### Sumario de la invención

35 Según la invención, se proporciona, entre otros, un objeto sólido con una superficie que comprende una capa de recubrimiento exterior, siendo dicha capa de recubrimiento exterior una composición biocompatible que comprende un polímero y una entidad anticoagulante seleccionada de glucosaminoglucano, polisacárido u oligosacárido, anticoagulante, capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombo (en la presente memoria "entidad anticoagulante"), entidad anticoagulante que está unida mediante enlaces covalentes a dicho polímero a través de un ligador que comprende un tioéter. Dichos objetos sólidos, especialmente productos sanitarios, son de ese modo no trombogénicos.

### 40 Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra fotografías de ejemplos de tubos de PVC en los que el lado luminal está recubierto y coloreado con azul de toluidina como se describe en los ejemplos 1.1-1.3.

### Descripción detallada de la invención

45 En general, la capa de recubrimiento exterior comprende una multiplicidad de entidades anticoagulantes, cada una de las cuales se une mediante enlaces covalentes al polímero mediante un ligador que comprende un tioéter.

Las entidades anticoagulantes son conocidas para los expertos en la materia y muchas de ellas son oligosacáridos o polisacáridos. Algunas de las entidades son glucosaminoglucanos incluyendo compuestos que contienen glucosamina, galactosamina y/o ácido urónico. Entre los glucosaminoglucanos más adecuados están los "restos heparina" y especialmente heparina de longitud total (es decir, heparina natural).

50 El término "resto de heparina" se refiere a una molécula de heparina, un fragmento de la molécula de heparina o un derivado o análogo de heparina. Los derivados de heparina pueden ser cualquier variación funcional o estructural de heparina. Las variaciones representativas incluyen sales de metal alcalino o de metal alcalino-térreo de heparina, tales como heparina sódica (por ejemplo, Hepsal o Pularín), heparina de potasio (por ejemplo, Clarín), heparina de

litio, heparina de calcio (por ejemplo, Calciparina), heparina de magnesio (por ejemplo, Cutheparina) y heparina de bajo peso molecular (preparada, por ejemplo, por despolimerización oxidativa o escisión desaminativa, por ejemplo, Ardeparina sódica o Dalteparina). Otros ejemplos incluyen heparán sulfato, heparinoides, compuestos a base de heparina y heparina con un contraión hidrófobo. Otras entidades anticoagulantes deseables incluyen composiciones de heparina sintética referidas como composiciones de "fondaparinux" que implican inhibición mediada por antitrombina III de factor Xa. Los derivados adicionales de heparina incluyen heparinas y restos heparina modificados mediante, por ejemplo, oxidación con peryodato (patente de EE. UU. 6 653 457) y otras reacciones de modificación conocidas en la técnica. Los restos heparina también incluyen los restos unidos a un ligador o espaciador como se describe a continuación. La heparina desulfatada es menos adecuada que otras formas de heparina debido a su no trombogenicidad reducida relativa a otras formas de heparina.

Convenientemente, la entidad anticoagulante es un único punto unido al ligador, en particular punto terminal unido. Cuando la entidad anticoagulante es un punto terminal unido al resto de heparina, se conecta convenientemente al ligador a través de su extremo reductor (referido a veces en la presente memoria como posición C1 del extremo reductor). La ventaja de la unión del punto terminal, especialmente de la unión del punto terminal reductor, es que la actividad biológica de la entidad anticoagulante (por ejemplo, el resto de heparina) se maximiza debido a la disponibilidad aumentada de los sitios de interacción de antitrombina cuando se compara con la unión en cualquier otro sitio en la entidad anticoagulante (por ejemplo, resto de heparina).

En el caso de que haya una multiplicidad de entidades anticoagulantes, por ejemplo, restos heparina, es posible que algunas o todas sean de un tipo diferente; sin embargo, en general, todas serán del mismo tipo.

El término "tioéter" se refiere a una unión entre un azufre y dos átomos de carbono. Esta unión se refiere a veces como "sulfuro". El azufre puede estar unido a dos átomos de carbono saturados (es decir, -C-S-C-) o puede estar unido a un átomo de carbono saturado y uno insaturado (es decir, -C-S-C=).

El término "tio" se refiere a un resto -S-H.

El objeto sólido puede ser cualquier objeto al que se deseen unir entidades anticoagulantes. En una realización, el objeto sólido es un producto sanitario, pero también se consideran otros objetos sólidos, por ejemplo, dispositivos analíticos y dispositivos de separación. Así, en una realización alternativa, el objeto sólido es un dispositivo analítico o un dispositivo de separación.

El término "producto sanitario" se refiere a dispositivos implantables o no implantables pero más normalmente a productos sanitarios implantables. Ejemplos de productos sanitarios implantables incluyen catéteres, stents incluyendo stents bifurcados, stents expandibles de balón, stents autoexpandibles, injertos de stents incluyendo injertos de stents bifurcados, vasos sanguíneos artificiales, dispositivos de seguimiento permanente sanguíneo, válvulas cardíacas artificiales, electrodos de marcapaso, alambres de guía, circuitos de derivación cardiopulmonar, cánulas, balones, dispositivos de remiendo de tejidos y bombas sanguíneas. Más ejemplos incluyen injertos incluyendo injertos vasculares e injertos bifurcados, cables conductores cardíacos y dispositivos suministradores de fármaco. Ejemplos de productos sanitarios no implantables son dispositivos extracorpóreos, por ejemplo, dispositivos de tratamiento sanguíneo extracorpóreo y dispositivos de transfusión.

Los productos sanitarios pueden presentar aplicación neurológica, periférica, cardíaca, ortopédica, dérmica y ginecológica, entre otras.

Un dispositivo analítico puede ser, por ejemplo, un soporte sólido para llevar a cabo un procedimiento analítico tal como cromatografía o un ensayo inmunológico, química reactiva o catálisis. Los ejemplos de esos dispositivos incluyen portaobjetos, perlas, placas de pozos, membranas, etc. Un dispositivo de separación puede ser, por ejemplo, un soporte sólido para llevar a cabo un procedimiento de separación tal como purificación de proteínas, cromatografía por afinidad o intercambio iónico. Los ejemplos de esos dispositivos incluyen filtros y columnas, etc.

Un producto sanitario puede presentar muchas capas de recubrimiento y el término "capa de recubrimiento exterior" se refiere a una capa de recubrimiento que, cuando se implanta el dispositivo en un paciente, está en contacto con los tejidos del paciente o está en contacto con fluidos corporales. Así, la capa de recubrimiento exterior puede ser la capa de recubrimiento en la superficie exterior y/o la interior de un dispositivo hueco o un dispositivo de estructura abierta tal como un stent.

Como producto sanitario, un dispositivo analítico o dispositivo de separación también puede presentar muchas capas de recubrimiento y el término "capa de recubrimiento exterior" se refiere a una capa de recubrimiento que se pone en contacto con una sustancia que se tiene que analizar, separar o manipular.

En su expresión más sencilla, el ligador consiste en el tioéter sólo. Sin embargo, más habitualmente el ligador comprende al menos un espaciador además del tioéter de manera que el tioéter se separará mediante un espaciador del polímero o el resto de heparina o ambos.

El Mp (peso molecular) del ligador es convenientemente de  $10^2$  a  $10^6$  Da y la longitud del ligador es convenientemente de 10 a  $10^3$  Å. Convenientemente, los ligadores y/o los espaciadores son cadenas lineales,

aunque también es posible que se unan varias, es decir, más de una, por ejemplo, de 2 a 100, preferiblemente 30 a 100 entidades (por ejemplo, restos de heparina) a un único ligador produciendo así un ligador ramificado con varias cadenas laterales con resto de heparina.

5 En algunas realizaciones, el ligador incluye uno o más anillos aromáticos. En otras realizaciones, el ligador no incluye anillos aromáticos. En algunas realizaciones, el ligador es hidrófilo, por ejemplo, puede comprender una cadena de PEG.

En un aspecto de la invención, el ligador puede estar formado por múltiples porciones, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco porciones, más normalmente tres, cuatro o cinco porciones, en el que cada porción comprende o consta de un tioéter o un espaciador.

10 Un ejemplo de un ligador de tres porciones comprende "espaciador A" entre el polímero y el tioéter, el propio tioéter y "espaciador B" entre el tioéter y la entidad anticoagulante. El peso molecular de los espaciadores A y B puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente  $10^1$  y  $10^3$  Da. En una realización, cualquiera o los dos espaciadores A y B pueden comprender un anillo aromático y en una realización alternativa, ni el espaciador A ni el espaciador B comprende un anillo aromático.

15 En este tipo de ligador, el espaciador A o el espaciador B o los dos pueden ser un espaciador hidrófilo, por ejemplo, una cadena de PEG.

Como se usa en la presente memoria, el término "cadena de PEG" se refiere a una cadena polimérica obtenible por polimerización de óxido de etileno, típicamente de peso entre  $10^2$  y  $10^6$  Da.

20 En algunos casos, el ligador puede comprender dos o más tioéteres. Por ejemplo, un resto ligador difuncional (por ejemplo, con un grupo SH en cada extremo), puede unirse en cada extremo respectivamente, a una entidad anticoagulante con funciones alquino/alqueno y un polímero con funciones alquino/alqueno dando como resultado el ligador que contiene dos tioéteres. Alternativamente, el uso de un ligador de bisalquino/alqueno puede unirse en cada extremo, respectivamente, a una entidad anticoagulante con funciones tiol y un polímero con funciones tiol dando también como resultado el ligador que contiene dos tioéteres.

25 Los ligadores con dos o más tioéteres comprenden convenientemente tres, cuatro o cinco porciones donde, como se expuso anteriormente, cada porción comprende un tioéter o un espaciador.

En una realización, el ligador tiene cinco porciones - "espaciador A" entre el polímero y un primer tioéter, el primer tioéter, "espaciador C" entre el primer tioéter y un segundo tioéter, el segundo tioéter y "espaciador B" entre el segundo tioéter y la entidad anticoagulante.

30 En esos casos, los pesos moleculares de los espaciadores A y B pueden ser, por ejemplo, entre aproximadamente  $10^1$  y  $10^3$  Da y el peso molecular del espaciador C puede estar entre aproximadamente  $10^2$  y  $10^6$  Da.

Convenientemente, uno o más de, el espaciador A y/o el espaciador B y/o el espaciador C, son hidrófilos, comprendiendo por ejemplo una cadena de PEG.

35 En una realización, el ligador entre la entidad anticoagulante tal como un resto de heparina y el polímero del recubrimiento exterior es un ligador no ramificado. En otra realización, el ligador entre la entidad anticoagulante tal como un resto de heparina y el polímero del recubrimiento exterior es un ligador ramificado en el que la ramificación contiene otra entidad anticoagulante tal como un resto de heparina.

El ligador puede ser biodegradable o no biodegradable pero es más convenientemente no biodegradable para que un objeto sólido recubierto, tal como un producto sanitario, sea no trombogénico durante un largo periodo de tiempo.

40 En el caso de que haya una multiplicidad de ligadores, es posible que algunos o todos ellos sean de un tipo diferente; sin embargo, convenientemente todos los ligadores son del mismo tipo.

45 En una realización, más de una entidad anticoagulante se une a un ligador (por ejemplo, más de una entidad anticoagulante se une a cada ligador (véase, por ejemplo, el ejemplo 1.1). En una realización, más de un ligador se une a una entidad anticoagulante (por ejemplo, más de un ligador se une a cada entidad anticoagulante) (véase, por ejemplo, el ejemplo 1.3).

La superficie puede comprender una capa de recubrimiento en un objeto sólido tal como un producto sanitario. El objeto sólido puede presentar una o más porciones que contienen espacios vacíos o poros. Los poros pueden estar dentro del objeto sólido y/o comprender al menos una superficie del objeto sólido. Un ejemplo de un objeto sólido poroso es el politetrafluoroetileno (PTFEe) expandido.

50 El objeto sólido, puede soportar una o más, por ejemplo, 2 o más, o 3 o 4 o 5, por ejemplo, hasta 20 capas de recubrimiento de manera que se cubra deseablemente una porción de la superficie (se desea que sea no trombogénica) o se cubra el total de la superficie del objeto (películas finas multicapa ISBN: 978-3-527-30440-0). El número óptimo de capas dependerá del tipo de material del que se fabrique el objeto y el uso considerado de la

superficie. La superficie puede ser, si se desea, construida capa a capa. El número y la naturaleza de las capas necesarias para proporcionar un cubrimiento completo de la superficie pueden determinarlos fácilmente los expertos en la materia. La capa o las capas de recubrimiento pueden conformarse por adsorción en la superficie del objeto sólido de polímero catiónico de peso molecular promedio alto, por ejemplo, una poliamina (por ejemplo, la conocida como Polymin® disponible en BASF, véase también la patente europea EP 0 086 187 Larsson y Gölander) y si es necesario reticular la poliamina con, por ejemplo, un reticulador de aldehído tal como crotonaldehído y/o glutaraldehído, seguido por la aplicación de una disolución de un polímero aniónico, por ejemplo, un polisacárido aniónico, por ejemplo, sulfato de dextrano, para obtener al menos una capa adsorbida del polisacárido. Por lo tanto, la superficie puede comprender una capa de poliamina de peso molecular promedio alto y una capa de polisacárido aniónico. Más en general, la superficie puede comprender una o más bicapas de recubrimiento de polímero catiónico (por ejemplo, poliamina) y polímero aniónico (por ejemplo, polisacárido aniónico), siendo la capa más interna una capa de polímero catiónico y siendo la capa externa una capa de polímero catiónico a la que la entidad anticoagulante se une mediante enlaces covalentes mediante un ligador que comprende un tioéter. Este procedimiento de recubrimiento se realiza esencialmente como se describe en la patente europea EP-B-0495820. Así, es solo la capa de recubrimiento exterior la que comprende la entidad anticoagulante. Típicamente, la capa de recubrimiento exterior a la que se une la entidad anticoagulante no está reticulada.

El procedimiento de la patente europea EP-B-0495820 puede modificarse, sin embargo, de manera que la capa exterior sea el polisacárido aniónico que se hace reaccionar después, como se describe a continuación, con una poliamina a la que se une la entidad anticoagulante o una poliamina con grupo o grupos funcionales capaces de formar un ligador que comprende un tioéter.

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

Así, un aspecto de la invención es un objeto sólido, por ejemplo, un producto sanitario con una superficie en la que la superficie comprende una o más bicapas de recubrimiento de polímero catiónico y polímero aniónico, siendo la capa más interna una capa de polímero catiónico y siendo la capa más externa una capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico a la que se une mediante enlaces covalentes una entidad anticoagulante a través de un ligador que comprende un tioéter.

El polímero de la capa de recubrimiento exterior es típicamente una poliamina y la capa de recubrimiento exterior puede formarse como se describió anteriormente, usando el procedimiento descrito en la patente europea EP-B-0495820 o una modificación de este procedimiento, en el que se hace reaccionar un polímero aniónico, típicamente un polisacárido, con una poliamina a la que se une la entidad anticoagulante o un grupo funcional capaz de formar un ligador que comprende un tioéter.

Otro aspecto de la invención es un objeto sólido no trombogénico, especialmente un producto sanitario no trombogénico con una superficie que comprende una capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico funcionalizado, según lo cual se une una entidad anticoagulante a la capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico mediante un ligador que comprende un tioéter.

Hay una serie de maneras de formar un tioéter, pero entre las más adecuadas está la reacción de un primer compuesto que contiene un grupo tiol con un segundo compuesto que contiene un grupo alqueno o uno alquilo. Los compuestos primero y segundo pueden ser cada uno el polímero del que está constituida la capa de recubrimiento exterior y la entidad anticoagulante como sea apropiado.

En el caso de que el segundo compuesto se derivatice con un alqueno, en una realización se usa un alqueno activado. Un ejemplo de un alqueno activado adecuado es un derivado de maleimida.

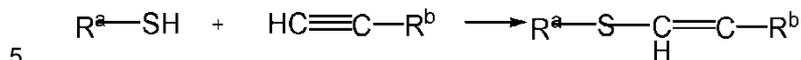
Como se indica a continuación, puede tener lugar opcionalmente reacción en presencia de un agente reductor tal como hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina o alternativamente ditiotretol o borohidruro de sodio, para evitar o anular la eficacia del acoplamiento no deseable de dos grupos tiol por oxidación.

En una realización, la reacción se inicia con un iniciador de radicales. Un ejemplo de un iniciador de radicales es el ácido 4,4'-azobis(4-cianovalérico). Más ejemplos son persulfato de potasio, dihidrocloreto de 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano] y cloruro de 4-(trimetilamonioetil)benzofenona.

En otra realización, la reacción no se inicia con un iniciador de radicales. En su lugar, se usan condiciones de mayor pH (por ejemplo, pH 8-11). Este tipo de reacción es más adecuado cuando se usa un alqueno o alquino activado para reacción con el tiol.

En general, sin embargo, es preferible emplear condiciones ácidas debido a que estas condiciones parecen ser las más compatibles con la heparina y los materiales de recubrimiento.

La reacción entre un primer compuesto que contiene un grupo tiol y un segundo compuesto que contiene un grupo alquino puede representarse como sigue:



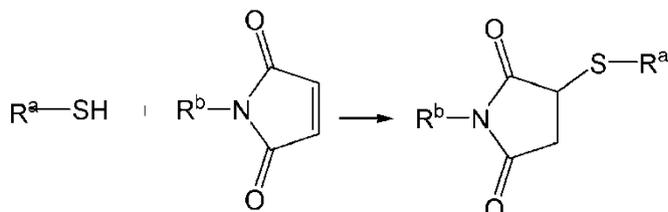
donde uno de  $R^a$  y  $R^b$  es el polímero y el otro de  $R^a$  y  $R^b$  es la entidad anticoagulante.

Se describe la reacción en el ejemplo 1.1, donde  $R^a$  es heparina y  $R^b$  es una poliamina y en el ejemplo 1.3, donde  $R^a$  es poliamina y  $R^b$  es heparina. Se puede llevar a cabo la reacción, por ejemplo, en presencia de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina como agente reductor y ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) como iniciador de radicales y en condiciones ácidas.

Sí está presente un exceso del compuesto  $R^a-SH$ , puede haber adición además por el doble enlace del alqueno para producir un compuesto que contenga dos grupos  $R^a$  unidos a un único grupo  $R^b$ .

De nuevo, esto se ilustra en el ejemplo 1.1, donde algunos de los ligadores tienen más de un grupo heparina unido y en el ejemplo 1.3, donde algo de la heparina está unido a varios ligadores.

15 La reacción entre un primer compuesto que contiene un grupo tiol y un segundo compuesto que contiene un grupo maleimido puede representarse como sigue:



donde uno de  $R^a$  y  $R^b$  es el polímero y el otro de  $R^a$  y  $R^b$  es la entidad anticoagulante.

20 Esto se describe con detalle en el ejemplo 1.2, donde  $R^a$  es heparina y  $R^b$  es una poliamina. La reacción se lleva a cabo, en general, en presencia de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina como agente reductor y ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) como iniciador de radicales y en condiciones ácidas.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para preparar un objeto sólido no trombogénico, por ejemplo, un producto sanitario no trombogénico, comprendiendo el procedimiento:

25 (a) tratar un objeto sólido tal como un producto sanitario para que presente una superficie que comprenda una capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico que se haya funcionalizado para soportar grupos tiol;

(b) hacer reaccionar dicha capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico que se ha funcionalizado para soportar grupos tiol con una entidad anticoagulante que se funcionaliza para soportar un grupo alqueno o alquino;

30 para unir según lo cual la entidad anticoagulante al polímero catiónico a través de un ligador que comprende un tioéter.

La invención también proporciona un objeto sólido, en particular un producto sanitario obtenible por este procedimiento.

35 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para preparar un objeto sólido no trombogénico, por ejemplo, un producto sanitario no trombogénico, comprendiendo el procedimiento:

(a) tratar un objeto sólido tal como un producto sanitario para que presente una capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico que se haya funcionalizado para soportar grupos alqueno o alquino;

40 (b) hacer reaccionar dicha capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico que se ha funcionalizado para soportar grupos alqueno con una entidad anticoagulante que se funcionaliza para soportar un grupo tiol;

para unir de ese modo la entidad anticoagulante al polímero catiónico a través de un ligador que comprende un tioéter.

También se describe en un objeto sólido, en particular un producto sanitario obtenible por este procedimiento.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para preparar un objeto sólido no trombogénico, por ejemplo, un producto sanitario no trombogénico, comprendiendo el procedimiento:

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

5 (b) asociar a dicha capa superficial de polímero catiónico un polímero catiónico funcionalizado que soporte una multiplicidad de entidades anticoagulantes con carga negativa tales como restos heparina que se unen al mismo mediante un ligador que comprende un tioéter, soportando dicho polímero catiónico una multiplicidad de entidades anticoagulantes con carga negativa y teniendo dicho polímero catiónico funcionalizado una carga negativa neta.

10 También se describe un objeto sólido, en particular un producto sanitario obtenible por este procedimiento.

Como se describió anteriormente, la superficie de polímero catiónico puede prepararse tratando el objeto sólido con un polímero catiónico de peso molecular promedio alto tal como una poliamina y, si es necesario, reticularla con, por ejemplo, un reticulador de aldehído. Pueden construirse opcionalmente más capas por etapas sucesivas de (i) aplicación de una disolución de polímero aniónico (por ejemplo, polisacárido aniónico) para obtener una capa adsorbida del polímero aniónico y (ii) tratar después además con polímero catiónico funcionalizado, tal como una poliamina, para proporcionar una capa adsorbida de recubrimiento exterior de polímero catiónico funcionalizado, estando funcionalizada la capa de recubrimiento exterior para soportar grupos tiol o grupos alqueno o alquino.

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

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para preparar un objeto sólido no trombogénico, por ejemplo, un producto sanitario no trombogénico, comprendiendo el procedimiento:

25 (a) tratar un objeto sólido tal como un producto sanitario para que presente una capa superficial de polímero aniónico;

(b) asociar a dicha capa superficial de polímero aniónico un polímero catiónico funcionalizado que soporte una multiplicidad de entidades anticoagulantes con carga negativa, tales como restos heparina, que se unen al mismo mediante un ligador que comprende un tioéter, soportando dicho polímero catiónico funcionalizado una multiplicidad de entidades anticoagulantes con carga negativa y teniendo una carga neta positiva.

También se describe un objeto sólido, en particular un producto sanitario obtenible por este procedimiento.

Como se describió anteriormente, el objeto sólido que presenta una capa superficial de polímero aniónico se prepara típicamente tratando el objeto (por ejemplo, producto sanitario) con un polímero catiónico de peso molecular promedio alto, tal como una poliamina, opcionalmente con reticulación, seguido por tratamiento de la superficie de poliamina con una disolución de polímero aniónico (por ejemplo, polisacárido aniónico) para obtener una capa externa adsorbida del polímero aniónico. Pueden construirse capas adicionales por las etapas sucesivas de (i) aplicación de un polímero catiónico (opcionalmente con reticulación) para proporcionar una capa adsorbida de polímero catiónico y (ii) tratarla después con una disolución de polímero aniónico (por ejemplo, polisacárido aniónico) para obtener una capa exterior adsorbida del polímero aniónico.

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

Como se usa en la presente memoria, una "poliamina" es una molécula con múltiples (por ejemplo, 10, 100, 1000 o más) grupos amino pendientes libres, conteniendo preferiblemente al menos algunos grupos amino primarios. Las poliaminas son típicamente moléculas poliméricas con múltiples grupos amino de peso molecular promedio alto, que tienen, por ejemplo, un peso molecular promedio de  $10^3$  -  $10^6$  Da. Una poliamina ejemplar es una polietilenimina tal como la conocida como Polymin® disponible en BASF.

El polímero catiónico puede ser funcionalizado usando técnicas conocidas en la técnica. Como se ilustra en los ejemplos a continuación, pueden usarse grupos amino primarios en la poliamina con puntos de unión para el grupo alqueno, alquino o tiol. Sin embargo, un experto conocería como adaptar la química para usar grupos amino secundarios en la poliamina como puntos de unión para el grupo alqueno, alquino o tiol. Por lo tanto, las poliaminas pueden ser funcionalizadas para soportar grupos alqueno, alquino o tiol por medios convencionales, por ejemplo, haciendo reaccionar grupos amino primarios pendientes en la poliamina con un ácido carboxílico activado (por ejemplo, un derivado de N-hidroxisuccinimida de un ácido carboxílico), ácido que soporta un grupo alqueno, alquino o tiol. Otro modo es hacer reaccionar aminas secundarias con ácidos carboxílicos con química de carbodiimida o hacerlas reaccionar con cloruros de ácido carboxílico donde la porción de ácido carboxílico soporta un grupo alqueno, alquino o tiol.

La entidad anticoagulante, por ejemplo, heparina, que soporta un grupo alqueno, alquino o tiol puede prepararse por métodos convencionales conocidos de por sí. Por ejemplo, una entidad anticoagulante, por ejemplo, heparina, que soporta un grupo alquino/alqueno puede prepararse por la reacción de una alcoxiamina de la fórmula:



en la que  $R^1$  es un grupo que contiene alquino/alqueno;

con un grupo aldehído o hemiacetal en la entidad anticoagulante usando técnicas convencionales conocidas de por sí. Este tipo de reacción se ilustra a continuación en el ejemplo 3b; la reacción transcurre mediante formación de una función oximiina para proporcionar un compuesto de la fórmula:



en la que  $R^1$  es como se definió anteriormente y  $R'$  es el resto de la entidad anticoagulante.

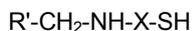
15 La heparina degradada con ácido nitroso y la heparina natural soportan grupos reactivos, un grupo aldehído y una función hemiacetal, respectivamente, en su extremo reductor que puede ligarse de esta manera.

De manera similar, una entidad anticoagulante derivatizada con un grupo tiol puede formarse por la reacción de un grupo aldehído o hemiacetal en la entidad anticoagulante con un compuesto de la fórmula:



donde X es un ligador hidrocarbonado, por ejemplo  $(CH_2)_n$  donde n es 1 a 8, por ejemplo, 1 a 4 o X es un ligador hidrocarbonado como se acaba de describir, en el que uno o más grupos metileno (por ejemplo, 1 o 2) se reemplazan por O o X comprende una cadena de PEG que contiene 1 a 100 (por ejemplo, 1 a 50, tal como 1 a 10) unidades etilenglicol;

25 para proporcionar un producto de la fórmula:



donde X es como se definió anteriormente y  $R'-CH_2-$  es el resto de la entidad anticoagulante.

30 Un ejemplo de dicho procedimiento se proporciona en el ejemplo 3a a continuación.

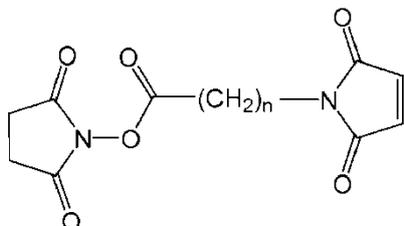
También debe introducirse un grupo funcional adecuado en el polímero de la capa de recubrimiento exterior de manera que pueda hacerse reaccionar con la entidad anticoagulante derivatizada.

Por ejemplo, un polímero de poliamina que soporte un número de grupos amino primarios representado como sigue:



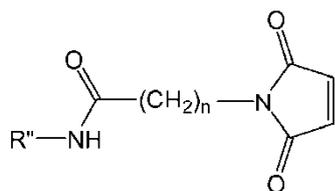
donde  $R''$  es el resto polimérico;

puede hacerse reaccionar con un compuesto de la fórmula:



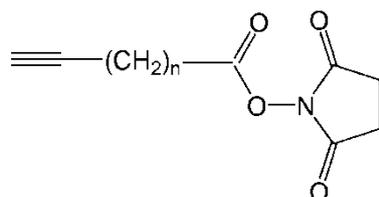
40 donde n es un número entero de 1 a 8, por ejemplo, 1 a 4;

para proporcionar una poliamina funcionalizada de maleimida de la fórmula:



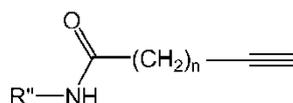
donde R'' y n son como se definió anteriormente. Esta reacción se ilustra con más detalle en el ejemplo 2a a continuación.

5 Alternativamente, el polímero de poliamina puede hacerse reaccionar con un grupo que contiene alquino activado de la fórmula:



donde n es un número entero de 1 a 8, por ejemplo, 1 a 4;

10 para proporcionar un polímero con funciones alquino de la fórmula:



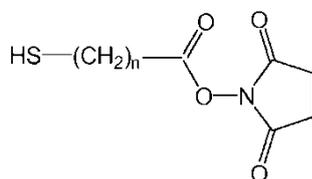
15 donde R'' y n son como se definió anteriormente. Esta reacción se ilustra con más detalle en el ejemplo 2b a continuación.

Alternativamente, si se desea que el polímero reaccione con una entidad anticoagulante derivatizada con alqueno o alquino, puede derivatizarse con un grupo tiol. En este caso, un polímero de poliamina que soporte una serie de grupos amino primarios representado como sigue:

20 R''-NH<sub>2</sub>

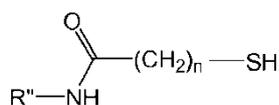
donde R'' es como se definió anteriormente;

puede hacerse reaccionar con un compuesto que contiene tiol activado, por ejemplo, un compuesto de la fórmula:



25 donde n es un número entero de 1 a 8, por ejemplo, 1 a 4;

para proporcionar un polímero derivatizado de la fórmula:



30 donde R'' y n son como se definió anteriormente. Esta reacción se ilustra con más detalle en el ejemplo 2c a continuación.

5 Cuando se usa una capa de recubrimiento, la superficie de todos los objetos sólidos se transforma para presentar la misma superficie exterior funcionalizada para la posterior unión de una entidad anticoagulante capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos. Por lo tanto, una ventaja específica de los procedimientos descritos en la presente memoria es que se crea, en general, una superficie no trombogénica muy uniforme (véase la figura 1). Esto es útil en particular cuando el objeto sólido es un producto sanitario.

El objeto sólido, por ejemplo, producto sanitario puede comprender un metal o un polímero orgánico o inorgánico, sintético o natural.

10 Así, por ejemplo, puede formarse de un polímero o material orgánico o inorgánico, sintético o natural, tal como polietileno, polipropileno, poliacrilato, policarbonato, poliamida, poliuretano (PU), poli(cloruro de vinilo) (PVC), polietercetona (PEEK), celulosa, silicona o caucho (poliisopreno), materiales plásticos, metales, vidrio, cerámica y otros materiales médicos conocidos o una combinación de esos materiales. Otros materiales de sustrato adecuados incluyen fluoropolímeros, por ejemplo, politetrafluoroetileno expandido (PTFEe), politetrafluoroetileno (PTFE), etileno-propileno fluorado (EPF), copolímeros de perfluorocarbono, por ejemplo, copolímeros de tetrafluoroetileno perfluoroalquilvinil éter (TFE/PAVE), copolímeros de tetrafluoroetileno (TFE) y perfluorometil vinil éter (PMVE) y combinaciones de lo anterior con y sin reticulación entre las cadenas poliméricas.

15 Metales adecuados incluyen aleación níquel-titanio (nitinol), acero inoxidable, titanio, cobalto, cromo, oro y platino. Se prefieren nitinol y acero inoxidable. También se prefiere titanio.

Una realización adecuada en particular de la presente invención se refiere a un producto sanitario recubierto.

20 Un producto sanitario puede ser implantable o no implantable. Ejemplos de productos sanitarios implantables o no implantables incluyen catéteres, stents, injertos de stents, vasos sanguíneos artificiales, dispositivos de seguimiento permanente sanguíneo, válvulas cardíacas artificiales, electrodos de marcapaso, alambres de guía, circuitos de derivación cardiopulmonar, cánulas, balones, dispositivos de remiendo de tejidos, bombas sanguíneas y dispositivos extracorpóreos, por ejemplo, dispositivos de tratamiento sanguíneo extracorpóreo y dispositivos de transfusión.

25 Se prefiere que la superficie recubierta a la que se une la entidad anticoagulante (por ejemplo, heparina u otro resto e heparina) sea de manera que conserve las propiedades no trombogénicas después de esterilización, por ejemplo, esterilización de óxido de etileno (OE).

La esterilización puede llevarse a cabo por medios conocidos para los expertos en la materia. El método preferido de esterilización es usar gas óxido de etileno. Alternativamente, pueden usarse otros métodos tales como radiación, por ejemplo, haz electrónico o radiación gamma, donde dicha radiación no degrade el objeto o el recubrimiento o ambos.

30 Una realización preferida de la presente invención se refiere a un producto sanitario recubierto para implante, por ejemplo, implante permanente, u otra posición, en un sitio anatómico. Otras realizaciones preferidas incluyen dispositivos de uso temporal tales como catéteres y circuitos extracorpóreos. Son ejemplos productos sanitarios estériles (por ejemplo, esterilizados) para su colocación en el interior de una estructura anatómica que delimite un espacio vacío, o lumen, para reforzar la estructura anatómica o mantener el espacio vacío. Convenientemente, la entidad anticoagulante unida, por ejemplo, heparina u otro resto de heparina, no eluye en ninguna extensión sustancial y permanece con el dispositivo. Por ejemplo, después de un enjuague de 15 horas con NaCl (0,15 M) previamente a ensayar la actividad de unión de AT retenida permanece adecuada (por ejemplo, mayor que 1 o 2 o 4 o 5 o 10 pmol/cm<sup>2</sup>) y cuando se ensaya en la prueba de evaluación de bucles de sangre (véase el ejemplo 1.4) con sangre fresca de un donante sano la reducción en recuento de plaquetas de la sangre después del ensayo es sustancialmente menor para la sangre expuesta a la superficie recubierta de acuerdo con la invención que la de un control no recubierto (por ejemplo, la reducción en el recuento de plaquetas después del ensayo para la sangre expuesta a la superficie recubierta es menor que 20%, preferiblemente menor que 15% y más preferiblemente menor que 10%).

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

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

50 Por ejemplo, se prefiere que la superficie, por ejemplo, del producto sanitario, tenga una actividad de unión de antitrombina (AT) de al menos 1, por ejemplo, al menos 5 picomoles de AT por centímetro cuadrado (pmol/cm<sup>2</sup>) de superficie. En otras realizaciones, la actividad de unión de AT es al menos 6 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 7 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 8 pmol/cm<sup>2</sup>, al menos 9 pmol/cm<sup>2</sup> o al menos 10 pmol/cm<sup>2</sup> de superficie. En algunas realizaciones, la actividad de unión de AT es al menos 100 pmol/cm<sup>2</sup> de superficie. Puede medirse la actividad de unión de AT por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Pasche., et al., en "Binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" *Artif.- Organs* 15: 481-491 (1991) y la patente de EE. UU. 2007/0264308. Por comparación, puede concluirse de Sanchez et al (1997) *J. Biomed. Mater. Res.* 37 (1) 37-42,

véase la figura 1, que los valores de unión de AT de alrededor de 2,7-4,8 pmol/cm<sup>2</sup> (dependiendo del montaje experimental) o más no parece que dé lugar a una actividad enzimática trombogénica significativa en contacto con plasma.

5 Alternativamente o adicionalmente, se prefiere que la superficie sea no trombogénica debido a su alta capacidad para eliminar la coagulación y otros sistemas de defensa en la prueba de evaluación de bucles de sangre descrita en el ejemplo 1.4. Según esa prueba, la superficie que se tiene que investigar se aplica a un tubo de PVC que se enjuaga durante 15 horas con NaCl 0,15 M previamente a ensayo con sangre fresca. No se indica trombogénica por una reducción en el recuento de plaquetas de la sangre medido después de la prueba que es sustancialmente menor para la sangre expuesta a la superficie preparada de acuerdo con el método descrito en la presente memoria  
10 que la de un control no recubierto (por ejemplo, la reducción en el recuento de plaquetas después del ensayo para la sangre expuesta a la superficie recubierta es menor que 20%, preferiblemente menor que 15% y más preferiblemente menor que 10%).

Pueden realizar otros métodos de evaluación de la sangre similares diferentes del modelo de bucle de sangre los expertos en la materia para valorar la trombogénica/no trombogénica.

15 La cantidad de la entidad anticoagulante ligada a una superficie particular puede controlarse y ajustarse, por ejemplo, ajustando la cantidad de los reactivos usada en la síntesis de la composición.

La distribución de la entidad anticoagulante en la superficie puede determinarse por técnicas de coloración convencionales que se conocen de por sí, por ejemplo, la distribución de heparina puede determinarse usando azul de toluidina.

20 De acuerdo con la invención, también se proporciona un procedimiento para la producción de un objeto sólido, en particular un producto sanitario, con una superficie que comprende una capa de recubrimiento exterior, siendo dicha capa de recubrimiento exterior una composición biocompatible que comprende un polímero y una entidad anticoagulante capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos, entidad anticoagulante que está unida mediante enlaces covalentes a dicho polímero a través de un ligador que  
25 comprende un tioéter, procedimiento que comprende la reacción de una correspondiente entidad anticoagulante que soporta un grupo alqueno o alquino con una correspondiente superficie que soporta un grupo tiol o la reacción de una correspondiente entidad anticoagulante que soporta un grupo tiol con una correspondiente superficie que soporta un grupo alqueno o alquino.

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

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

35 Según la invención, también se proporciona una poliamina que soporta una entidad anticoagulante a través de un ligador que comprende un tioéter.

En una realización en la que se utiliza la reacción la superficie soporta el grupo tiol. En otra realización en la que se utiliza la reacción, la entidad anticoagulante soporta el grupo tiol.

La reacción puede llevarse a cabo como se describió brevemente anteriormente y con más detalle en los ejemplos a continuación.

40 Mediante este nuevo método, la entidad anticoagulante, por ejemplo, heparina, puede unirse ventajosamente a la superficie por grupos superficiales que no están implicados en la construcción del recubrimiento de la superficie. Por el contrario, la técnica anterior descrita en las patentes europeas EP-B-0086186, EP-B-0086187 y EP-B-0495820, utiliza el mismo tipo de grupos (aminas primarias) en el procedimiento de recubrimiento de superficie capa a capa que los usados para unir la heparina al recubrimiento.

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

También se puede llevar a cabo la reacción, si se desea, en condiciones de flujo.

50 Según la invención, también se proporciona una entidad anticoagulante, por ejemplo, heparina u otro resto de heparina, entidad anticoagulante que soporta un grupo alqueno. También se proporciona una entidad anticoagulante, por ejemplo, un resto de heparina capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos, en la que la entidad anticoagulante soporta un grupo alqueno, grupo alqueno que está unido a un ligador, en la que el ligador está unido por el punto terminal a la entidad anticoagulante (por ejemplo, resto de heparina). Cuando la entidad anticoagulante es un resto de heparina, puede ser, por ejemplo, un resto de heparina de longitud total (es decir, heparina natural).

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

- 5 Según la invención, también se proporciona un objeto sólido, especialmente un producto sanitario, que tiene una superficie de poliamina que soporta un tiol o un alqueno, por ejemplo, un tiol o grupo alqueno que está conectado a un grupo amino de la superficie de poliamina mediante un ligador.

Según una característica más de la invención, también se proporciona un procedimiento para la producción de un objeto sólido, especialmente un producto sanitario con una superficie que comprende una capa de recubrimiento exterior, siendo dicha capa de recubrimiento exterior una composición biocompatible que comprende un polímero y una entidad anticoagulante capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos, entidad anticoagulante que está unida mediante enlaces covalentes a dicho polímero a través de un ligador que comprende un tioéter, en el que el objeto tiene una superficie que comprende una o más capas de polisacárido y poliamina, procedimiento que comprende la reacción de una correspondiente superficie con una capa externa de polisacárido que presenta una carga neta negativa (es decir, polisacárido aniónico, por ejemplo, que soporta grupos sulfato con carga negativa) con una poliamina que soporta una correspondiente entidad anticoagulante a través de un ligador que comprende un tioéter, con una carga neta positiva o la reacción de una correspondiente superficie con una capa externa de polisacárido que presenta una carga negativa neta (es decir, polisacárido aniónico, por ejemplo, que soporta grupos sulfato con carga negativa) con una poliamina que soporta un tiol o un grupo alqueno o alquino que tiene una carga neta positiva y hacer reaccionar el producto resultante con una entidad anticoagulante que soporta un grupo alqueno o alquino o un grupo tiol, respectivamente.

Las referencias a una poliamina que soporta una entidad anticoagulante o un tiol, grupos alqueno o alquino, incluyen referencias a una poliamina que soporta uno o más, es decir, una pluralidad de dichos grupos. Sin embargo, una poliamina que soporta una correspondiente entidad anticoagulante a través de un ligador que comprende un tioéter que tiene una carga neta positiva sólo soportará tantas entidades anticoagulantes con carga negativa como permita la carga neta para que se mantenga positiva neta.

Según una característica más de la invención, también se proporciona un procedimiento para la producción de un objeto sólido, por ejemplo, un producto sanitario, con una superficie que comprende una capa de recubrimiento exterior, siendo dicha capa de recubrimiento exterior una composición biocompatible que comprende un polímero y una entidad anticoagulante capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos, entidad anticoagulante que está unida mediante enlaces covalentes a dicho polímero a través de un ligador que comprende un tioéter, en el que el objeto presenta una superficie que comprende una o más capas de polisacárido (es decir, polisacárido aniónico, por ejemplo, que soporta grupos sulfato con carga negativa) y poliamina, procedimiento que comprende la reacción de una correspondiente superficie con una capa exterior de poliamina que presenta una carga neta positiva con una poliamina que soporta una multiplicidad de correspondientes entidades anticoagulantes a través de un ligador que comprende un tioéter de manera que dicha poliamina presenta una carga neta negativa.

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

La presencia de una carga neta positiva en una superficie puede determinarse por tratamiento con Ponceau S que colorearía una superficie con carga positiva de color rojo. La presencia de una carga neta negativa en una superficie puede determinarse por tratamiento con azul de toluidina que colorearía una superficie con carga negativa de color azul.

- 45 También se describe una poliamina funcionalizada, por ejemplo, Polymin® que soporta uno o más tioles o uno o más alquenos o uno o más alquinos, por ejemplo, mediante un ligador.

Según la invención, también se proporciona una poliamina funcionalizada que soporta una entidad anticoagulante unida a la misma a través de un ligador que comprende un tioéter. Esta poliamina puede utilizarse por procedimientos conocidos de por sí, por ejemplo, análogos a los descritos en otra parte en esta memoria descriptiva.

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

Puede controlarse el grado de sustitución de la entidad anticoagulante en la superficie;

Puede conseguirse tanto la unión del punto terminal (único punto) como la unión en múltiples puntos de la entidad anticoagulante, por ejemplo, heparina, aunque se prefiere la unión del punto terminal (especialmente punto terminal reductor);

- 55 Puede controlarse la longitud del ligador entre la entidad anticoagulante y la superficie;

- Puede usarse heparina de longitud total evitándose así la escisión de heparina y el desecho de partes del producto escindido implicadas en la degradación de ácido nitroso de la técnica anterior de la heparina;
- 5 Cuando se escinde heparina, puede destruirse la secuencia de unión de antitrombina en algunos de los fragmentos, usar por lo tanto heparina de longitud total o heparina ligada mediante un espaciador también puede mejorar la biodisponibilidad de la heparina ligada;
- Puede obtenerse una distribución uniforme de la entidad anticoagulante por la superficie;
- Puede obtenerse un recubrimiento uniforme que enmascare las propiedades intrínsecas, por ejemplo, que disminuya las propiedades trombogénicas, de un dispositivo sin tener en cuenta el material de su fabricación;
- 10 Puede obtenerse un recubrimiento que sea comparativamente liso;
- Puede mejorarse la biocompatibilidad del recubrimiento;
- Un recubrimiento según la presente invención puede reducir la necesidad de heparina sistémica y reducir la probabilidad de activación de contacto;
- 15 La biodisponibilidad de la entidad anticoagulante puede controlarse, por ejemplo, por el uso de diferentes ligadores (longitud, tipo);
- Puede obtenerse una superficie no trombogénica que no lixivie heparina y, por lo tanto, presente una larga duración;
- Puede obtenerse un dispositivo analítico o de separación con capacidad de unión mejorada a biomoléculas y
- 20 puede obtenerse un dispositivo analítico o de separación con duración de la actividad de la heparina prolongada.

También se describe una composición biocompatible que comprende una entidad anticoagulante capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos, entidad anticoagulante que está unida mediante enlaces covalentes a una superficie a través de un ligador que comprende un tioéter.

- 25 El experto apreciará que puede aplicarse la composición biocompatible a cualquier objeto sólido, del que es un ejemplo un producto sanitario. Por lo tanto, según otro aspecto de la invención, se proporciona un objeto sólido con una superficie que comprende (por ejemplo, recubierta con) dicha composición biocompatible.

La invención se ilustra por los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1.1: Preparación de una superficie no trombogénica en PVC

- 30 Se conecta una superficie que comprende capas de polímero laminado y polisacárido sulfatado con una capa exterior de polímero aminado funcionalizado, con heparina funcionalizada formando de ese modo un tioéter.

Se trató previamente una superficie de PVC usando el método descrito por Larm et al., en las patentes europeas EP-B-0086186 y EP-495820 (capa a capa; interacciones de carga del polielectrolito) terminando con una capa de polisacárido sulfatado.

- 35 Se limpió la superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) con isopropanol y un agente oxidante. La imprimación se construyó por adsorción alterna de una poliamina (Polymin®) con carga positiva y polisacárido sulfatado con carga negativa (sulfato de dextrano). La poliamina se reticula con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada par de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 4 bicapas terminando con el polisacárido sulfatado.

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

- Se añadió 1,0 mL de una disolución al 5 % de poliamina con funciones alquino (preparación, véase el ejemplo 2b) a 500 mL de un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. La adsorción de la poliamina con funciones alquino a la superficie de sulfato se llevó a cabo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un enjuague con agua de dos minutos después de la adsorción para eliminar el polímero en exceso.
- 45

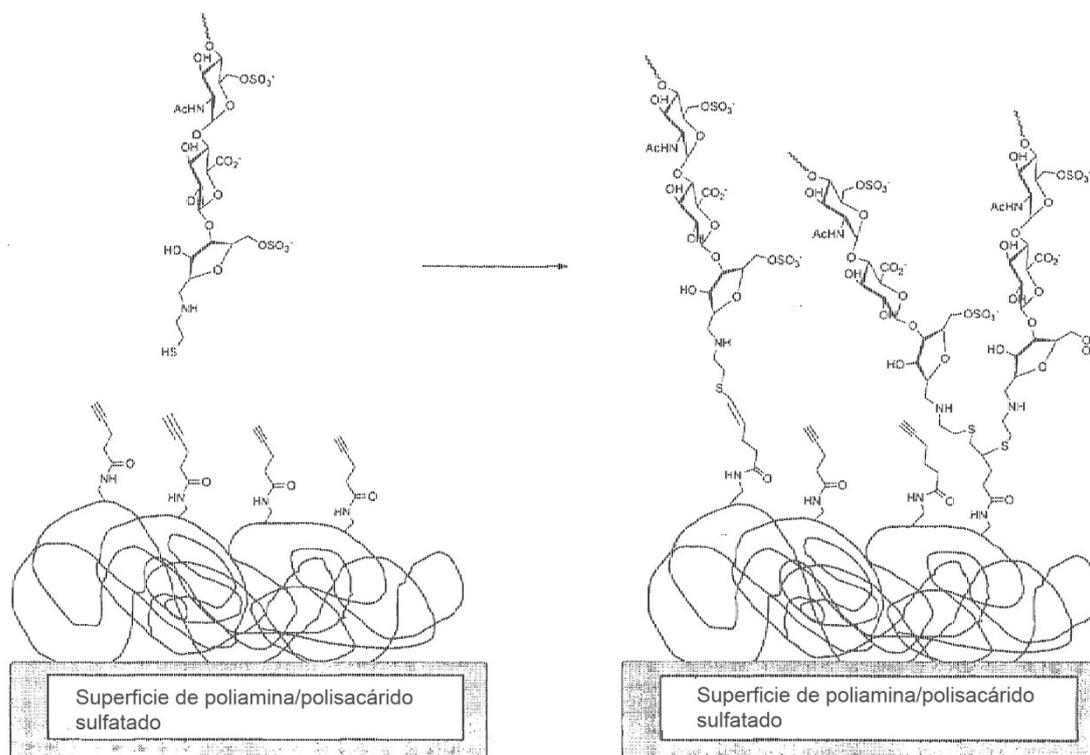
Se disolvieron 500 mg de heparina degradada con nitrito, con función tiol en C1 del extremo reductor (preparado como en el ejemplo 3a), en 1000 mL de agua desionizada y se añadieron 50 mg de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina, 500 mg de ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) y 2,9 g de NaCl. Se ajustó el pH a 3,7 con HCl (ac.)

1 M.

Se llevó a cabo la reacción entre la disolución de la heparina con funciones tiol y la superficie con funciones alquino a 70°C durante 3 h. Se realizó purificación enjuagando heparina no ligada mediante enlaces covalentes durante 10 minutos usando un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. Se realizó un enjuague final con agua desionizada durante dos minutos para lavar los residuos de sal de tampón.

5

El flujo usando durante el procedimiento completo fue 100 mL/min.



10 Se colorearon las muestras con azul de toluidina ("AzT") (200 mg/L en agua) sumergiéndolas en la disolución durante 2 minutos seguido por aclarado exhaustivo con agua. El AzT se une a la heparina por interacción iónica. Las muestras mostraron una intensa coloración uniforme con AzT, véase la figura 1.

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

15 Se midió la actividad de unión de antitrombina de heparina ligada esencialmente como se describe en Pasche., et al., en "Binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" Artif.- Organs 15: 481-491 (1991).

No trombogénica cuando se ensaya por el bucle de sangre - véase el ejemplo 1.4

Ejemplo 1.2: Preparación de una superficie no trombogénica en PVC

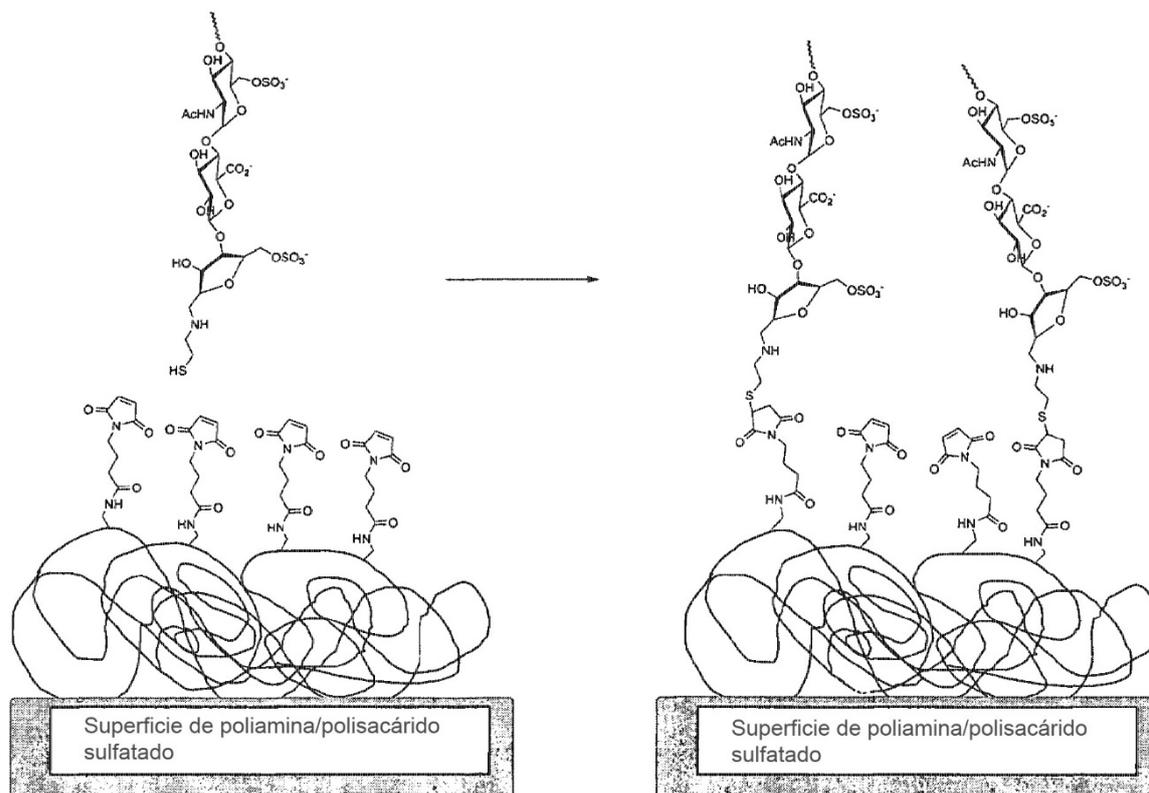
20 La superficie luminal de un tubo de PVC (diámetro interno 3 mm) se limpió con isopropanol y un agente oxidante. Después se imprimó con cuatro bicapas de una poliamina (Polymin) con carga positiva y un polisacárido sulfatado con carga negativa (sulfato de dextrano) terminando con el polisacárido sulfatado.

25 Después, la siguiente etapa de recubrimiento utilizó una disolución de 10 mL de una disolución al 1 % de poliamina con funciones maleimida (preparada como en el ejemplo 2a) en 1000 ml de un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. Se realizó la adsorción de la poliamina con funciones maleimida a la superficie de sulfato durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un enjuague con agua de dos minutos después de la adsorción para eliminar el polímero en exceso.

Se disolvieron 500 mg de heparina degradada con nitrito, con función tiol en C1 del extremo reductor (preparado como en el ejemplo 3a), en 1000 mL de agua desionizada y 50 mg de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina, 500 mg de ácido 4,4'-azobis(4-cianovalérico) y 2,9 g de NaCl. Se ajustó el pH a 3,7 con HCl (ac.) 1 M.

La reacción entre la disolución de la heparina con función tiol y la superficie con función maleimida se llevó a cabo a 70 °C durante 3 h. Se llevó a cabo purificación por eliminación por aclarado de heparina no ligada mediante enlaces covalentes durante 10 minutos usando un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. Se realizó un enjuague final con agua desionizada durante dos minutos para lavar los residuos de sal de tampón.

- 5 El flujo usado durante el procedimiento completo fue 100 mL/min.



La coloración con AzT (como se describe en el ejemplo 1.1) mostró una coloración intensa uniforme después de recubrimiento, véase la figura 1.

Actividad de unión de antitrombina de heparina ligada: 8,0 pmol/cm<sup>2</sup>

- 10 No trombogénica cuando se ensaya por el bucle de sangre - véase el ejemplo 1.4

Ejemplo 1.3 Preparación de una superficie no trombogénica en PVC

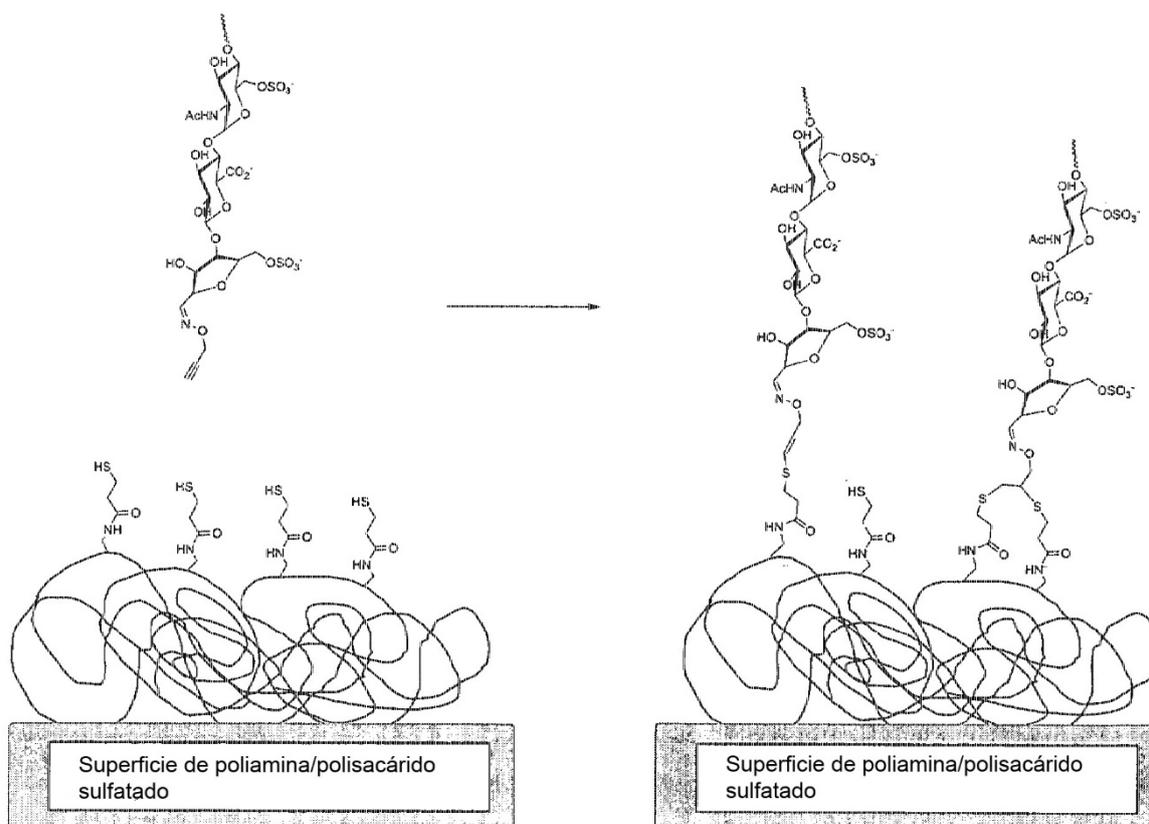
La superficie luminal de un tubo de PVC (diámetro interno 3 mm) se limpió con isopropanol y un agente oxidante. Después se imprimó con cuatro bicapas de una poliamina (Polymin) con carga positiva y un polisacárido sulfatado con carga negativa (sulfato de dextrano) terminando con el polisacárido sulfatado.

- 15 Después, la siguiente etapa de recubrimiento utilizó una disolución de 5 mL de una disolución al 1 % de poliamina con funciones tiol (preparada como en el ejemplo 2c) en 125 mg de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina en 500 ml de un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. Se realizó la adsorción de la poliamina con funciones tiol a la superficie de sulfato durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un enjuague con agua de dos minutos después de la adsorción para eliminar el polímero en exceso.

- 20 Se disolvieron 250 mg de heparina degradada con nitrito, con función alquino en C1 del extremo reductor (preparado como en el ejemplo 3b), en 500 mL de agua desionizada y 25 mg de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina, 250 mg de ácido 4,4'-azobis(4-cianoaléxico) y 1,4 g de NaCl. Se ajustó el pH a 3,7 con HCl (ac.) 1 M.

- 25 La reacción entre la disolución de la heparina con función alquino y la superficie con función tiol se llevó a cabo a 70 °C durante 3 h. Se llevó a cabo purificación por eliminación por aclarado de heparina no ligada mediante enlaces covalentes durante 10 minutos usando un tampón de borato/fosfato 0,04 M/0,04 M a pH 8,0. Se realizó un enjuague final con agua desionizada durante dos minutos para lavar los residuos de sal de tampón.

El flujo usado durante el procedimiento completo fue 100 mL/min.



5 La coloración con AzT (como se describe en el ejemplo 1.1) mostró una coloración intensa uniforme después de recubrimiento, véase la figura 1.

Actividad de unión de antitrombina de heparina ligada: 1,0 pmol/cm<sup>2</sup>

No trombogénica cuando se ensaya por el bucle de sangre - véase el ejemplo 1.4

Ejemplo 1.4 Ensayo de evaluación de bucle de sangre

10 Se realizó evaluación de bucle de sangre en las muestras del tubo de PVC recubierto de manera luminal de los ejemplos 1.1-1.3 para mostrar la bioactividad de la heparina conservada de la superficie no trombogénica. Primero se lavó el lado luminal de los tubos recubiertos con NaCl 0,15 M durante 15 horas a un flujo de 1 mL/min para asegurar que se eliminaba por aclarado toda la heparina ligada suelta y quedaba una superficie estable. Después se incubaron los tubos lavados en un modelo de bucle Chandler realizado esencialmente según Anderson *et al.* (Andersson, J.; Sanchez, J.; Ekdahl, K. N.; Elgue, G.; Nilsson, B.; Larsson, R. J Biomed Mater Res A 2003, 67 (2), 458-466) a 2 rad/s (20 rpm). Se contaron las plaquetas, de sangre fresca y de sangre recogida de los bucles, en un contador de células para medir la pérdida de plaquetas, lo que indica trombosis. Como referencias se incluyó un control no trombogénico (es decir, Carmeda<sup>®</sup> BioActive Surface applied to PVC, que se preparó esencialmente como se describe en la patente europea EP-B-0495820), un tubo de PVC no recubierto y un control trombogénico (es decir, un recubrimiento de tres bicapas con una capa exterior de polisacáridos sulfatados que no une antitrombina).

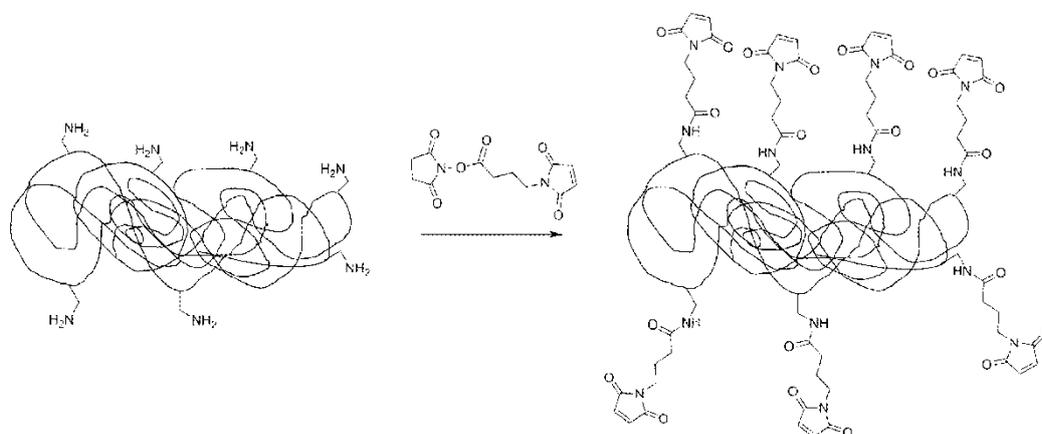
20 Como se observa en la tabla a continuación, no se observa virtualmente pérdida de plaquetas (la pérdida de plaquetas indica trombosis) para los recubrimientos preparados como se describe en los ejemplos 1.1-1.3. El tubo de PVC no recubierto y la superficie con una capa exterior de polisacáridos sulfatados (que no une antitrombina) muestran una pérdida significativa de plaquetas en este experimento.

|  | Superficies evaluadas     | Recuento de plaquetas x 10 <sup>9</sup> /L | Pérdida en recuento de plaquetas, % |
|--|---------------------------|--|-------------------------------------|
| Valor inicial, bucle antes de bucle Chandler |                           | 202  |                                     |
| Superficies evaluadas según la invención     | Del ejemplo 1.1           | 206  | 0                                   |
|  | Del ejemplo 1.2           | 190  | 6                                   |
|  | Del ejemplo 1.3           | 199  | 1                                   |
| Superficies de referencia                    | Control no trombogénico   | 194  | 4                                   |
|  | Tubo de PVC no recubierto | 57   | 72                                  |
|  | Control trombogénico      | 9  | 96                                  |

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

Ejemplo 2a: Funcionalización con maleimida de Polymin SN

5



10

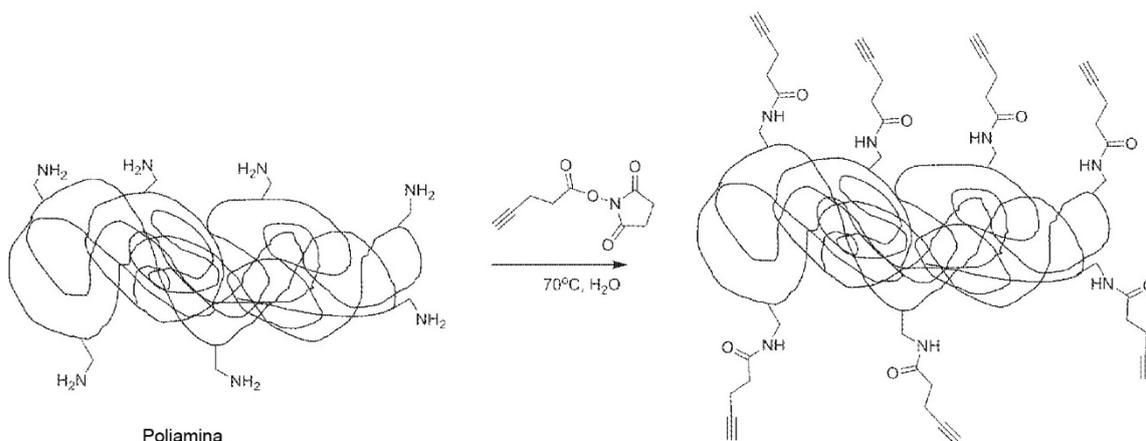
Se diluyó Polymin SN (Lupasol SN; Lupasol es un nombre comercial alternativo para Polymin) con agua para preparar una disolución de reserva (se añadieron 5 g de Polymin SN a 20 mL de agua purificada). (Polymin es un tensioactivo catiónico de polietilenimina disponible en BASF).

15

Se disolvió ácido 4-maleimidobutírico (0,50 g, 2,7 mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (0,32 g, 2,7 mmol) en 3 mL de diclorometano y se agitó a 0 °C. Se añadió lentamente una disolución de N, N'-diciclohexilcarbodiimida (0,56 g, 2,7 mmol) en 3 mL de diclorometano a la mezcla de reacción a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche y se filtraron los subproductos y se concentró el ácido 4-maleimidobutírico activado con NHS y se secó a vacío.

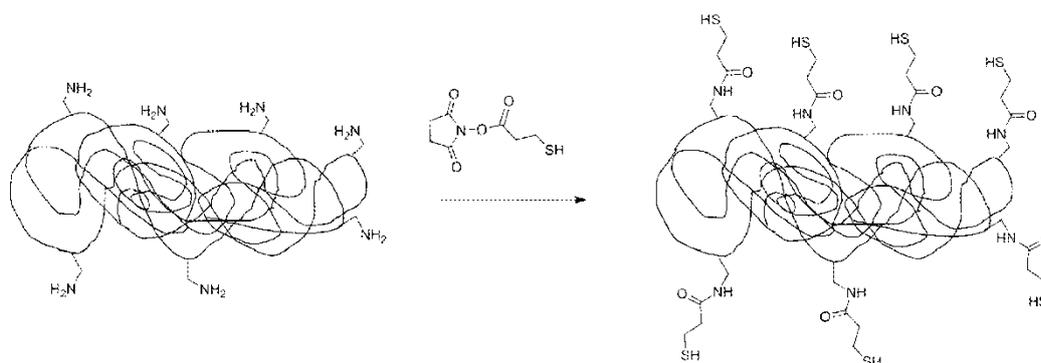
Se disolvió el ácido 4-maleimidobutírico activado con NHS seco en 30 mL de agua purificada y se mezcló con 7,6 mL de la disolución de reserva de Polymin SN a 0 °C y se dejó que reaccionara durante la noche a temperatura ambiente para obtener una disolución al 1 % de Polymin con funciones maleimida.

Ejemplo 2b: Funcionalización con alquino de Polymin SN



5 Se mezcló una disolución de N-hidroxisuccinimida-(4-pentinoato) (Ref: Salmain, M.; Vessieres, A.; Butler, I. S.; Jaouen, G. *Bioconjugate Chemistry* 1991, 2 (1), 13-15) (3,90 g, 19,0 mmol) en 20 mL de agua purificada con 24 mL de la disolución de reserva de Polymin SN (véase el ejemplo 2a) y se dejó que reaccionara durante la noche a 70 °C. Se diluyó después la mezcla de reacción con agua e isopropanol (mín. 99%, calidad PhEur, Merck) hasta que precipitó el polímero. Se separó por decantación el isopropanol y se separó por evaporación el isopropanol residual de la suspensión resultante.

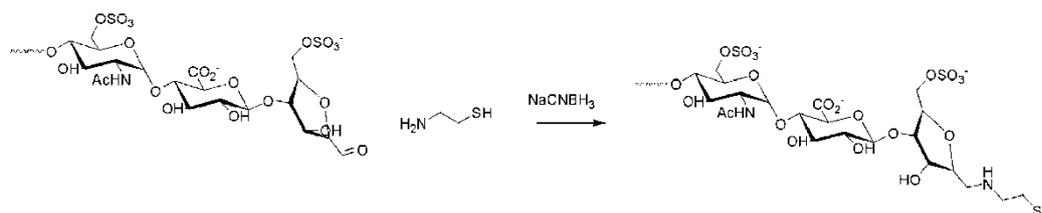
10 Ejemplo 2c: Funcionalización con tiol de Polymin SN



15 Se disolvió ácido 3-mercaptopropiónico (1,00 g, 9,4 mmol) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (1,09 g, 9,4 mmol) en 1 mL de diclorometano y se agitó a 0 °C en atmósfera inerte (Ar). Se añadió lentamente una disolución de N, N'-diciclohexilcarbodiimida (1,94 g, 9,4 mmol) en 10 mL de diclorometano, a la mezcla de reacción a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche en atmósfera inerte (Ar) a temperatura ambiente y se filtraron los subproductos de y se concentró el ácido 3-mercaptopropiónico activado con NHS y se secó a vacío.

20 El ácido 3-mercaptopropiónico activado con NHS seco se disolvió en 115 mL de agua purificada y se mezcló con 28,6 mL de la disolución de reserva de Polymin SN (véase el ejemplo 2a) a 0 °C y se dejó que reaccionara durante la noche en atmósfera inerte (Ar) a temperatura ambiente para obtener una disolución al 1 % de Polymin con funciones tiol.

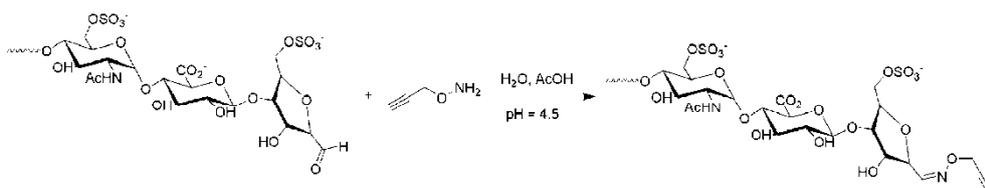
Ejemplo 3a: Preparación de heparina degradada con ácido nitroso con funciones tiol



25

5 Se disolvió heparina degradada con ácido nitroso con grupos aldehído (preparada esencialmente como en el ejemplo 2 de la patente de EE. UU. USP 4 613 665) (5,00 g, 1,0 mmol), hidrocloreto de cisteamina (0,57 g, 5,0 mmol) y cloruro de sodio (0,6 g) en agua purificada. Se ajustó el pH a 6,0 con NaOH (ac) 1 M y HCl (ac) 1 M. Se añadieron a la disolución 3,1 ml de NaCNBH<sub>3</sub> (ac.) al 5 % (0,16 g, 2,5 mmol) y se agitó la reacción durante la noche a temperatura ambiente. Se ajustó el pH a 11,0 con NaOH (ac.) 1 M y se dializó el producto resultante frente a agua purificada con una membrana de diálisis SpectraPor mwco (peso molecular umbral, por sus siglas en inglés) 1 kD (anchura plana 45 mm) durante tres días. Se concentró después la mezcla de reacción y se liofilizó para obtener 2,6 g de un polvo suelto blanco.

10 Ejemplo 3b: Preparación de heparina degradada con ácido nitroso con funciones alquino



Reactivos:

15 (i) Heparina degradada con ácido nitroso con grupos aldehído (preparada esencialmente como en el ejemplo 2 de la patente de EE. UU. 4 613 665) 3,25 g de peso seco (0,65 mmol)

(ii) Hidrocloreto de O-(prop-2-ynil)-hidroxilamina (Ref: Xu, R.; Sim, M. K.; Go, M. L., Synthesis and pharmacological characterization of O-alkynyloximes of tropinone and N-metilpiperidinone as muscarinic agonists. J Med Chem 1998, 41, (17), 3220-3231) 0,70 g de peso seco (6,5 mmol).

20 (iii) Ácido acético (100 % Merck) 3 mL

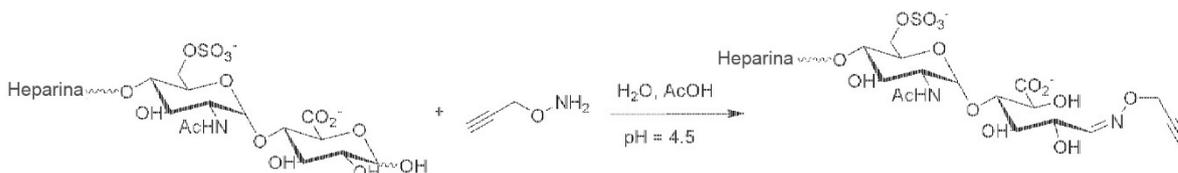
(iv) Agua purificada 50 mL

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

25 Se analizó el producto funcionalizado por FTIR que mostró una señal típica del alquino a 3100 cm<sup>-1</sup>.

La actividad de la heparina funcionalizada fue 96 UI/mg, que indica que la actividad de la heparina funcionalizada no se veía afectada sustancialmente por la funcionalización.

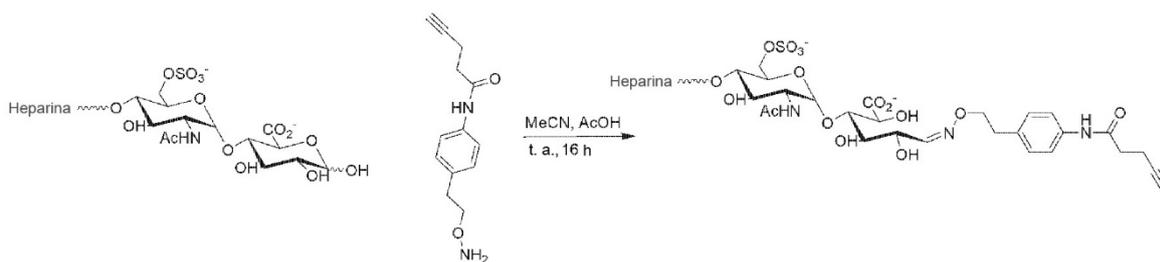
Ejemplo 3c: Preparación de heparina natural con funciones alquino



30 Se funcionalizó la heparina natural (SPL, Scientific Protein Laboratories, lote n.º 1037) según los procedimientos descritos en el ejemplo 3b.

La actividad de la heparina funcionalizada fue 211 UI/mg, que indica que la actividad de la heparina funcionalizada no se veía afectada sustancialmente por la funcionalización.

35 Ejemplo 3d: Preparación de heparina natural con funciones alquino con espaciador aromático



5 Se disolvió la heparina natural (SPL, Scientific Protein Laboratories, lote n.º 1037) (20 mg) en 250 µL de ácido acético (100 % Merck) y añadieron 250 µL de agua purificada y 6 µL de N-(4-(2-(aminooxi)etil)fenil)pent-4-inamida de disolución de reserva (véase el ejemplo 5 a continuación). Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se concentraron los productos de reacción y se coevaporaron con tolueno (3 x 2 mL) para proporcionar un sólido amarillento (~ 20 mg).

Preparación de compuestos intermedios

Ejemplo 5: Ligador bifuncional

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

10 Se disolvieron (4-pentinoato) de N-hidroxisuccinimida (Ref: Malkoch, M.; Schleicher, K.; Drockenmuller, E.; Hawker, C. J.; Russell, T. P.; Wu, P.; Fokin, V. V., Structurally Diverse Dendritic Libraries: A Highly Efficient Functionalization Approach Using Click Chemistry. *Macromolecules* 2005, 38, (9), 3663-3678.) (200 mg, 1,0 mmol) y p-aminofeniletanol (125 mg, 0,9 mmol) en 2 mL de diclorometano junto con trietilamina (140 µL, 1,0 mmol) y 5 gotas de dimetilformamida. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró el producto de reacción bruto, se disolvió en 10 mL de acetato de etilo y se lavó con 5 mL de agua seguido por 5 mL de HCl (ac.) 0,5 M, 5 mL de 10 NaHCO<sub>3</sub> (ac.) finalmente 5 mL de agua. Se secó la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó el disolvente. Se purificó más el producto por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de tolueno (T) y acetato de etilo (E) de 4:1 a 1:2 (T:E). El producto N-(4-(2-(hidroxi)etil)fenil)pent-4-inamida se caracterizó por RMN y MALDI-TOF.

20 5 b) N-(4-(2-(metanosulfonato)etil)fenil)pent-4-inamida

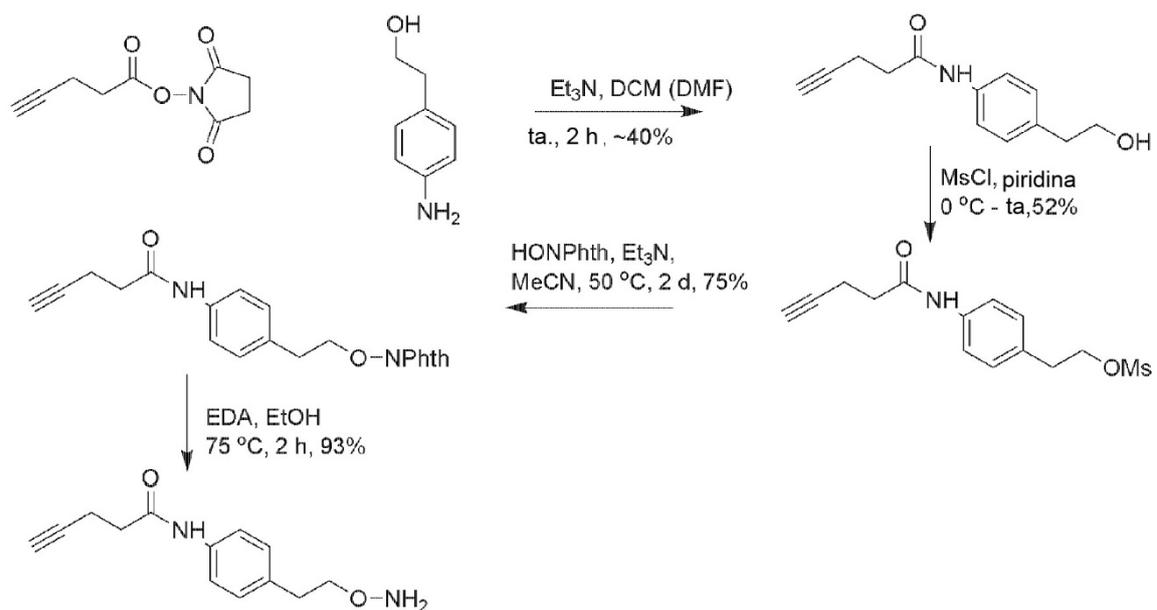
25 Se disolvió N-(4-(2-(hidroxi)etil)fenil)pent-4-inamida (210 mg, 1,0 mmol) en 4 mL de piridina. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (MsCl) (100 µL, 1,3 mmol) a 0°C. Se llevó de nuevo la reacción agitada a temperatura ambiente y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se evaporó el disolvente y el resto se redisolvió en 10 mL de acetato de etilo y se lavó con 5 mL de agua seguido por 5 mL de HCl (ac.) 0,1 M y finalmente 5 mL de agua. Se secó la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó el disolvente para proporcionar el producto N-(4-(2-(metanosulfonato)etil)fenil)pent-4-inamida.

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

30 Se disolvió la N-(4-(2-(metanosulfonato)etil)fenil)pent-4-inamida en 6 mL de acetonitrilo y se añadió a una disolución de N-hidroxiifalimida (200 mg, 0,9 mmol) y trietilamina (250 µL, 1,8 mmol) en 2 mL de acetonitrilo. Se agitó la mezcla de reacción a 50 °C durante 2 días. Después se diluyó la mezcla de reacción con 40 mL de acetato de etilo y se lavó con 20 mL de HCl (ac.) 0,5 M, 5 x 30 mL de 10 NaHCO<sub>3</sub> (ac.) para retirar el color rojo y finalmente 5 mL de agua. Se secó la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó el disolvente. Se recristalizó el producto bruto de 10 mL de tolueno para obtener N-(4-(2-(N-oxifalimido)etil)fenil)pent-4-inamida que se caracterizó por RMN y MALDI-TOF.

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

35 Se disolvió N-(4-(2-(N-oxifalimido)etil)fenil)pent-4-inamida (20 mg, 5,5 µmol) y etilendiamina (200 µL, 3,0 mmol) en 2 mL de etanol. Se agitó la reacción a 75 °C durante 2 horas. Se evaporó el disolvente y se purificó el producto bruto por cromatografía de columna sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de tolueno (T) y acetato de etilo (E) de 2:1 a 1:3 (T:E). El producto N-(4-(2-(aminooxi)etil)fenil)pent-4-inamida se caracterizó por RMN y MALDI-TOF.



Preparación de disolución de reserva:

Se puso N-(4-(2-(aminooxi)etil)fenil)pent-4-inamida (2,5 mg) en un matraz medidor y se añadió acetonitrilo (1000  $\mu\text{L}$ ) para disolver el ligador.

## REIVINDICACIONES

1. Un objeto sólido con una superficie que comprende una capa de recubrimiento exterior, siendo dicha capa de recubrimiento exterior una composición biocompatible que comprende un polímero y una entidad anticoagulante capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos, entidad anticoagulante que está unida mediante enlaces covalentes a dicho polímero a través de un ligador que comprende un tioéter, en el que dicha entidad anticoagulante es un glucosaminoglucano, polisacárido u oligosacárido, anticoagulante.
2. Un objeto sólido según la reivindicación 1, en el que la entidad anticoagulante es un resto de heparina unido en el punto terminal conectado a través de su extremo reductor.
3. Un objeto sólido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la superficie comprende dos o más capas de recubrimiento, estando unida sólo la capa de recubrimiento exterior a la entidad anticoagulante.
4. Un objeto sólido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la superficie comprende una o más bicapas de recubrimiento de polímero catiónico y polímero aniónico, siendo la capa más interna una capa de polímero catiónico y siendo la capa más externa una capa de polímero catiónico a la que está unida mediante enlaces covalentes la entidad anticoagulante mediante un ligador que comprende un tioéter.
5. Un objeto sólido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que más de una entidad anticoagulante está unida a un ligador.
6. Un objeto sólido según la reivindicación 4, en el que el recubrimiento comprende una poliamina como polímero catiónico.
7. Un objeto sólido según la reivindicación 6, en el que el recubrimiento comprende una capa de una poliamina de peso molecular promedio alto como polímero catiónico y una capa de un polisacárido aniónico como polímero aniónico.
8. Un objeto sólido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, objeto que presenta una actividad de unión de antitrombina III de al menos 1 picomol de antitrombina III por centímetro cuadrado ( $\text{pmol}/\text{cm}^2$ ) de superficie.
9. Un procedimiento para la producción de un objeto sólido con una superficie que comprende una capa de recubrimiento exterior, siendo dicha capa de recubrimiento exterior una composición biocompatible que comprende un polímero y una entidad anticoagulante capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos, entidad anticoagulante que está unida mediante enlaces covalentes a dicho polímero a través de un ligador que comprende un tioéter; procedimiento que comprende la reacción de una correspondiente entidad anticoagulante que soporta un grupo alqueno o alquino con una correspondiente superficie que soporta un grupo tiol o la reacción de una correspondiente entidad anticoagulante que soporta un grupo tiol con una correspondiente superficie que soporta un grupo alqueno o alquino, en el que dicha entidad anticoagulante es un glucosaminoglucano, polisacárido u oligosacárido, anticoagulante.
10. Un procedimiento según la reivindicación 9, que comprende:
- (a) tratar un objeto sólido para que presente una capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico que se haya funcionalizado para soportar grupos alqueno o alquino;
- (b) hacer reaccionar dicha capa de recubrimiento exterior de polímero catiónico que se ha funcionalizado para soportar grupos alqueno o alquino con una entidad anticoagulante que se funcionaliza para soportar un grupo tiol;
- para unir de ese modo la entidad anticoagulante al polímero catiónico a través de un ligador que comprende un tioéter.
11. Un procedimiento según la reivindicación 9, que comprende:
- (a) tratar un objeto sólido para que presente una capa superficial de polímero catiónico;
- (b) asociar a dicha capa superficial de polímero catiónico un polímero catiónico funcionalizado que soporta una multiplicidad de entidades anticoagulantes con carga negativa tales como restos heparina que se unen al mismo mediante un ligador que comprende un tioéter, soportando dicho polímero catiónico una multiplicidad de entidades anticoagulantes con carga negativa y dicho polímero catiónico funcionalizado con una carga negativa neta
- o
- (a) tratar un objeto sólido para que presente una capa superficial de polímero aniónico;

(b) asociar a dicha capa superficial de polímero aniónico un polímero catiónico funcionalizado que soporta una multiplicidad de entidades anticoagulantes con carga negativa tales como restos heparina que se unen al mismo mediante un ligador que comprende un tioéter, soportando dicho polímero catiónico funcionalizado una multiplicidad de entidades anticoagulantes con carga negativa y con una carga positiva neta.

- 5
12. Un objeto sólido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el objeto sólido es un producto sanitario.
13. Un objeto sólido con una superficie de poliamina que soporta un tiol o un grupo alqueno.
- 10 14. Un resto de heparina capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos, resto de heparina que soporta un grupo alqueno, alqueno que está unido a un ligador, en el que el ligador se une en el punto terminal al resto de heparina a través de su extremo reductor.
- 15 15. Una poliamina funcionalizada que soporta una entidad anticoagulante a través de un ligador que comprende un tioéter, en la que dicha poliamina funcionalizada es capaz de interactuar con sangre de mamífero para evitar la coagulación o la formación de trombos y en la que dicha entidad anticoagulante es un glucosaminoglucano, polisacárido u oligosacárido, anticoagulante.

Figura 1

