

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 976**

51 Int. Cl.:

A61L 33/00 (2006.01)
A61L 33/08 (2006.01)
A61L 33/06 (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01)
A61L 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2008 PCT/US2008/012595**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2009 WO09064372**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2008 E 08850202 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2205294**

54 Título: **Entidades biológicamente activas inmovilizadas, que tienen un alto grado de actividad biológica**

30 Prioridad:

09.11.2007 US 938162

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

01.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 644 976 T3

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

DESCRIPCIÓN

Entidades biológicamente activas inmovilizadas, que tienen un alto grado de actividad biológica

Antecedentes de la invención

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

10 La inmovilización de entidades biológicamente activas sobre materiales de sustrato en una forma biológicamente activa implica una evaluación de las composiciones químicas respectivas de la entidad y del material de sustrato. Puede ser necesaria la modificación de la composición química de un material de sustrato para inmovilizar una entidad biológicamente activa sobre el mismo. Esto se consigue normalmente tratando las superficies del material de sustrato para generar una población de elementos o grupos químicamente reactivos, seguido por la inmovilización de la entidad biológicamente activa con un protocolo apropiado. Con otros materiales de sustrato, las superficies de un material de sustrato se cubren, o recubren, con un material que tiene grupos químicos reactivos incorporados en el mismo. Las entidades biológicamente activas se inmovilizan entonces sobre el material de sustrato a través de los grupos químicos reactivos del material de recubrimiento. Han sido descritos varios esquemas para la cubierta, o recubrimiento de los materiales de sustrato. Ejemplos representativos de entidades biológicamente activas inmovilizadas en un material de sustrato con un material de cubierta o recubrimiento, están descritos en las patentes de Estados Unidos números: 4.810.784; 5.213.898; 5.897.955; 5.914.182; 5.916.585; y 6.461.665.

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

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

30 Lin et al. (Journal of Vascular and Interventional Radiology, Vol. 14 n° 5, 2003, pp 603-611) describen un estudio sobre los efectos de la colocación de una endoprótesis iliaca expandible con globo recubierta de heparina en la hiperplasia intimal en un modelo de babuino.

40 El documento WO2007/133699A2 (Gore Enterprise Holding, Inc.) describe la inmovilización de entidades biológicamente activas que tienen actividad de unión a la antitrombina III, en donde dichas entidades biológicamente activas retienen una actividad biológica importante después de la manipulación mecánica de un material de sustrato en el cual están inmovilizadas las entidades.

45 Existe la necesidad de productos sanitarios que tengan entidades biológicamente activas inmovilizadas sobre ellos sin pérdida significativa de actividad biológica, particularmente cuando las entidades biológicamente activas inmovilizadas sean sometidas a esterilización, compactación y expansión mecánicas, y/o almacenamiento. Un producto sanitario de este tipo debería tener composiciones o compuestos biológicamente compatibles incluidos con las entidades biológicamente activas inmovilizadas que sirvan para minimizar la degradación de la actividad biológica de las entidades durante la inmovilización, esterilización, compactación y expansión mecánicas, y/o almacenamiento. En algunos casos, las composiciones o compuestos biológicamente compatibles adicionales aumentarán la actividad biológica de algunas entidades biológicamente activas después de un procedimiento de esterilización. Las entidades biológicamente activas de particular interés para la inmovilización tienen propiedades antitrombóticas.

Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere a productos sanitarios que comprenden: un material de sustrato; un material de recubrimiento polimérico unido al menos a una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de entidades biológicamente activas que tienen actividad de unión al cofactor II de la heparina unidas covalentemente al menos a una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, comprendiendo dicha

5 pluralidad de entidades biológicamente activas disulfato de dermatán; y una composición orgánica biológicamente compatible que comprende un glucosaminoglucano, dextrano, sulfato de dextrano, polietilenglicol o glicerol, en donde la composición orgánica biológicamente compatible se combina de forma no covalente con dichas entidades biológicamente activas y con dicho material de recubrimiento polimérico; en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de la heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2).

10 Las entidades biológicamente activas se inmovilizan en combinación con composiciones químicas orgánicas biológicamente compatibles adicionales que permiten que las entidades biológicamente activas retengan una actividad significativa de unión al cofactor II de la heparina, especialmente después de la exposición de las entidades inmovilizadas a las condiciones de procesamiento y almacenamiento que de otro modo degradarían la actividad biológica de las entidades. En algunas realizaciones, las composiciones químicas orgánicas biológicamente compatibles adicionales proporcionan funciones complementarias a los sustratos o recubrimientos en los que se inmovilizan las entidades biológicamente activas.

15 Un material de sustrato adecuado es cualquier material con una superficie que tiene grupos químicos reactivos que son capaces de inmovilizar covalentemente la entidad biológicamente activa en una forma biológicamente activa en una o más superficies del material de sustrato. Los materiales de sustrato también pueden tener una multiplicidad de grupos químicos reactivos añadidos a las superficies de los materiales a través de la aplicación de una o más composiciones o materiales de recubrimiento, a las superficies. Al menos una porción de un material de recubrimiento tiene elementos, grupos, compuestos o componentes químicos que son reactivos para las entidades biológicamente activas y sirven para inmovilizar covalentemente la entidad biológicamente activa en una forma biológicamente activa, en el material de recubrimiento.

20 Después de la inmovilización de una pluralidad de las entidades biológicamente activas en al menos una porción de una multiplicidad de grupos químicos reactivos presentes sobre un material de sustrato y/o material de recubrimiento, la composición orgánica biológicamente compatible adicional se combina de forma no covalente con las entidades biológicamente activas y con el material de recubrimiento polimérico. La composición orgánica biológicamente compatible interactúa con las entidades biológicamente activas y los grupos químicos reactivos del material de sustrato y/o con el material de recubrimiento para evitar que las entidades biológicamente activas pierdan actividad biológica en condiciones que de otro modo podrían degradar significativamente la actividad biológica de las entidades. Estas condiciones incluyen la esterilización y el almacenamiento. Con los productos sanitarios endoluminales expandibles, por ejemplo, la compactación y la expansión mecánicas de tales dispositivos pueden degradar también significativamente la actividad biológica de las entidades.

25 En algunos casos, la composición orgánica biológicamente compatible adicional parece que mantiene la actividad biológica de las entidades, particularmente durante la inmovilización, esterilización, almacenamiento, y/o manipulación mecánica, mediante la limitación de las alteraciones indeseables de las entidades inducidas a menudo por la inmovilización, esterilización, almacenamiento, y/o un proceso de manipulación mecánica. Las alteraciones que disminuyen la actividad podrían incluir los cambios conformacionales en una entidad biológicamente activa que ocultan un sitio activo sobre la entidad. Las alteraciones que disminuyen la actividad podrían incluir también las interacciones entre entidades biológicamente activas inmovilizadas vecinas. Los reordenamientos de las entidades biológicamente activas inmovilizadas con respecto a un material de recubrimiento polimérico son otras posibles alteraciones de las entidades que disminuyen su actividad. La simple desnaturalización u otra degradación, de las entidades biológicamente activas inmovilizadas podrían ser otros medios por los cuales las entidades pierden actividad biológica. Como se describe en mayor detalle en la presente memoria, las entidades biológicamente activas inmovilizadas, esterilizadas, almacenadas, y/o manipuladas mecánicamente en presencia de la composición orgánica biológicamente compatible adicional pueden retener un grado de actividad biológica significativamente mayor que una entidad biológicamente activa inmovilizada similar en las mismas condiciones en ausencia de la composición orgánica biológicamente compatible adicional.

30 La composición orgánica biológicamente compatible adicional se puede eliminar de un producto sanitario esterilizado durante el proceso posterior a la esterilización o la composición se puede eliminar por los procesos fisiológicos de un receptor del implante después de la implementación del producto sanitario esterilizado en un sitio de implantación.

35 Las entidades biológicamente activas reducen o inhiben la formación de trombos sobre las superficies de un sustrato y/o material de recubrimiento y comprenden disulfato de dermatán.

40 En otras realizaciones, la actividad de unión a la antitrombina es de al menos 12 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato, o de al menos 20 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato. En algunas realizaciones, la actividad de unión al cofactor II de la heparina es de al menos 50 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato.

45 Se describe también un producto sanitario que comprende un material de sustrato, un material de recubrimiento polimérico unido al menos a una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de entidades biológicamente activas que tienen una actividad de unión al cofactor II de la heparina de al menos 5 picomoles de

cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) unidas covalentemente al menos a una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, y una composición biológicamente compatible combinada con dicho material de recubrimiento polimérico, en donde dicha composición biológicamente compatible tiene actividad de unión a la antitrombina III.

- 5 En otra realización, la presente invención se refiere a un producto sanitario que comprende: un material de sustrato; un material de recubrimiento polimérico unido al menos a una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de entidades biológicamente activas que tienen una actividad de unión al cofactor II de la heparina, unidas covalentemente al menos a una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, comprendiendo dicha pluralidad de entidades biológicamente activas disulfato de dermatán; y una composición orgánica biológicamente compatible que comprende un glucosaminoglucano, dextrano, sulfato de dextrano, polietilenglicol o glicerol, en donde la composición orgánica biológicamente compatible está combinada de forma no covalente con dichas entidades biológicamente activas y dicho material de recubrimiento polimérico; en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de la heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2), que comprende además una segunda pluralidad de entidades biológicamente activas que tienen una actividad de unión a la antitrombina III, unidas covalentemente al menos a una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de la heparina de al menos 5 picomoles de antitrombina III por centímetro cuadrado.

20 Se describe también un producto sanitario que comprende un material de sustrato, una pluralidad de entidades químicas que tienen actividad de unión al cofactor II de la heparina presente sobre al menos una porción de dicho material de sustrato, una primera composición biológicamente compatible combinada con dicho material de sustrato, y una segunda composición biológicamente compatible mezclada con ellos.

25 Se describe también un producto sanitario que comprende un material de sustrato, un material de recubrimiento polimérico unido al menos a una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de entidades químicas que tienen actividad de unión al cofactor II de la heparina presente sobre al menos una porción de dicho material de recubrimiento polimérico, una primera composición biológicamente compatible combinada con dicho material de sustrato, y una segunda composición biológicamente compatible mezclada con ellos.

30 En una realización al menos una porción de la composición orgánica biológicamente compatible se libera a menudo del producto sanitario esterilizado o manipulado mecánicamente en unas horas cuando se coloca en una solución tampón de fosfato 0,15 M que tiene una temperatura de aproximadamente treinta y siete grados centígrados y un pH sustancialmente neutro. La presencia de los compuestos liberados se puede detectar en la solución tampón con técnicas rutinarias de ensayo.

35 En algunas realizaciones de la descripción, la composición orgánica biológicamente compatible se puede mezclar antes de la manipulación mecánica y/o de la esterilización. En otras realizaciones, la composición orgánica biológicamente compatible se puede mezclar después de la manipulación mecánica o de la esterilización (es decir, en un quirófano). Esto es particularmente útil cuando la composición orgánica se puede degradar a través de la manipulación mecánica o de la esterilización de un sustrato o dispositivo que utiliza la composición. Esto permite también que la composición orgánica se pueda colocar en sitios particulares sobre un sustrato o dispositivo y en dosis variables.

40 **Breve descripción de los dibujos**

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

La Figura 1A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico.

45 La Figura 2 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo.

La Figura 3 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una multiplicidad de grupos químicos reactivos sobre el mismo.

La Figura 3A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una multiplicidad de grupos químicos reactivos sobre el mismo.

50 La Figura 4 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo.

La Figura 4A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo.

La Figura 5 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene una pluralidad de

entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellos.

5 La Figura 6 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellos.

La Figura 6A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellos.

10 La Figura 6B es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo que muestra alguna de las composiciones biológicamente compatibles ilustradas en la Figura 6 que han sido liberadas del material de sustrato y del material de recubrimiento polimérico.

15 La Figura 6C es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene un material de recubrimiento polimérico con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo que muestra alguna de las composiciones biológicamente compatibles ilustradas en la Figura 6A que han sido liberadas del material de sustrato y del material de recubrimiento polimérico.

La Figura 7 es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene tres capas de material de recubrimiento polimérico aplicadas al mismo con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellos.

20 La Figura 7A es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene tres capas de material de recubrimiento polimérico aplicadas al mismo con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo y una composición biológicamente compatible adicional combinada con ellos.

25 La Figura 7B es una representación esquemática de un material de sustrato polimérico que tiene tres capas de material de recubrimiento polimérico aplicadas al mismo con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo que muestra alguna de las composiciones biológicamente compatibles ilustradas en la Figura 7 que han sido liberadas del material de sustrato y del material de recubrimiento polimérico.

30 La Figura 7C es una representación esquemática de un material de sustrato metálico que tiene tres capas de material de recubrimiento polimérico aplicadas al mismo con una pluralidad de entidades biológicamente activas inmovilizadas en el mismo que muestra alguna de las composiciones biológicamente compatibles ilustradas en la Figura 7A que han sido liberadas del material de sustrato y del material de recubrimiento polimérico.

La Figura 8 es un gráfico de barras que ilustra cómo la esterilización de la heparina no unida no reduce significativamente la actividad biológica de la heparina.

35 La Figura 9 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una variedad de composiciones orgánicas biológicamente compatibles sobre la actividad biológica de la heparina unida en el punto del extremo inmovilizada a grupos químicos reactivos sobre un material de recubrimiento polimérico durante y después de la exposición de la heparina inmovilizada a un régimen de esterilización con óxido de etileno.

40 La Figura 10 es un gráfico de barras que ilustra la capacidad de las composiciones orgánicas biológicamente compatibles de heparina o de sulfato de dextrano añadidas para dar como resultado altos niveles de actividad de unión a ATIII de la heparina inmovilizada a un material de recubrimiento polimérico sobre un sustrato durante y después de la exposición de la heparina inmovilizada a un régimen de esterilización con óxido de etileno.

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

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

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

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

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

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

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

10 La Figura 18 es una representación esquemática de realizaciones de la presente invención que tienen una segunda composición biológicamente compatible combinada con ellas.

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

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

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

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a materiales y dispositivos con entidades biológicamente activas que tienen actividad de unión al cofactor II de la heparina inmovilizadas en los mismos. Las entidades biológicamente activas retienen una actividad biológica significativa después de las condiciones de inmovilización, esterilización, compactación y expansión mecánicas, y/o de almacenamiento que de otro modo disminuirían significativamente la actividad de unión al cofactor II de heparina de las entidades inmovilizadas. La actividad biológica de una entidad biológica inmovilizada sometida a dichas condiciones puede ser influenciada positivamente por la presencia de al menos una composición biológicamente compatible adicional combinada de forma no covalente con las entidades biológicamente activas. La composición adicional es un compuesto orgánico. En las realizaciones preferidas, la composición adicional es un glucosaminoglucano. Los glucosaminoglucanos preferidos son composiciones de heparina, análogos de heparina, derivados de heparina, disulfato de dermatán, análogos de disulfato de dermatán, y derivados de disulfato de dermatán.

30 Con referencia a las figuras 1 y 2, algunos materiales de sustrato poliméricos (12) tienen multiplicidades de grupos químicos reactivos (16) que pueblan al menos una porción de las superficies de los materiales de sustrato a las cuales una pluralidad de entidades biológicamente activas (17), están unidas o enlazadas covalentemente, a los materiales del sustrato (12) a través de los grupos químicos reactivos (16). Las superficies del material de sustrato polimérico (12) puede ser lisas, rugosas, porosas, curvadas, planas, angulares, irregulares, o combinaciones de estas. En algunas realizaciones, los materiales de sustrato con poros en la superficie tienen espacios internos vacíos que se extienden desde la superficie porosa del material hasta el cuerpo del material. Estos materiales de sustrato porosos tienen material de sustrato interno que bordea los poros que a menudo proporciona superficies aptas para la inmovilización de las entidades biológicamente activas. Ya sean porosos o no porosos, los materiales de sustrato pueden estar en la forma de filamentos, películas, láminas, tubos, mallas, tejidos, no tejidos, y combinaciones de los mismos.

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

Los materiales de sustrato pueden tener también una multiplicidad de grupos químicos reactivos añadidos a las superficies de los materiales a través de la aplicación de una o más composiciones o materiales de recubrimiento, a

las superficies. Al menos una porción de un material de recubrimiento tiene elementos, grupos, compuestos o componentes químicos que son reactivos para las entidades biológicamente activas y sirven para unir covalentemente la entidad biológicamente activa en una forma biológicamente activa al material de recubrimiento. El material de recubrimiento se puede aplicar en la forma de un soluto, partícula, dispersión, recubrimiento, o superposición y se puede unir al material de sustrato de varias maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, enlace covalente, adsorción, tal como, fisorción o quimisorción, y enlace no covalente, tal como enlace de hidrógeno o enlace iónico. En realizaciones preferidas, el material de recubrimiento se aplica en una solución y forma una capa de película continua o discontinua sobre una o más superficies del material de sustrato después de la separación del disolvente. El material de recubrimiento se puede aplicar en una o más capas. Los constituyentes químicos del material de recubrimiento en cada capa pueden ser los mismos o diferentes. En algunas realizaciones, el material de recubrimiento se reticula en sí mismo o con otros materiales de recubrimiento en otras capas. Los enlaces de reticulación pueden ser covalentes o iónicos.

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

Al menos un tipo de entidad biológicamente activa que tiene capacidad de unión al cofactor II de la heparina (17) está unida covalentemente a grupos químicos reactivos adecuados (16) sobre el material de sustrato (12, 14) y/o sobre el material de recubrimiento (18).

Las composiciones orgánicas biológicamente compatibles (11, 15, 100) comprenden un glucosaminoglucano, dextrano, sulfato de dextrano, polietilenglicol o glicerol.

Las entidades biológicamente activas (17) comprenden disulfato de dermatán. Un glucosaminoglucano complejo, el disulfato de dermatán tiene muchas funciones biológicas, y la actividad biológica de un anticoagulante basada en su capacidad para actuar como un catalizador para la inhibición de la trombina por el cofactor II de heparina (HCII). El disulfato de dermatán se puede producir a partir de sulfato de dermatán en una reacción sintética descrita en la patente de Estados Unidos N° 5.922.690. Una descripción adicional de la síntesis de disulfato de dermatán se encuentra en la patente de Estados Unidos N° 5.705.493.

La composición de polisacárido más preferida para inmovilización en la presente invención es una composición de polisacárido que tiene un grupo aldehído terminal libre preparada según lo indicado en la patente de Estados Unidos N° 4.613.665, expedida para Larm. El polisacárido utilizado es un disulfato de dermatán preparado según la patente de Estados Unidos N° 5.922.690. En el procedimiento de fabricación de disulfato de dermatán con un grupo aldehído terminal libre, el disulfato de dermatán se somete a una degradación por diazoación para formar un fragmento que tiene un grupo aldehído terminal libre. El grupo aldehído terminal libre permite que la composición de disulfato de dermatán sea "unida en el punto del extremo" a grupos aminos primarios de un material de sustrato o de recubrimiento polimérico para formar una imina que por reducción se convierte en una amina secundaria. La unión en el punto del extremo de la composición de disulfato de dermatán permite que el disulfato de dermatán sea inmovilizado en una conformación que expone muy ventajosamente la porción biológicamente activa de la composición de disulfato de dermatán a los componentes de la sangre responsables de la coagulación y formación de trombos. Cuando se expone a los componentes de la sangre responsables de la formación de trombos y de la coagulación, el disulfato de dermatán inmovilizado óptimamente interactúa con los componentes de la sangre para reducir o evitar la formación de trombos u otros sucesos de coagulación sobre las superficies del material de sustrato y/o de recubrimiento.

A pesar de un esquema de inmovilización optimizado, la actividad biológica de una entidad biológica basada en disulfato de dermatán se reduce significativamente durante la esterilización, la compactación y la expansión mecánicas, y/o el almacenamiento de las entidades (Figuras 9, 11, 12 y 13). Como se ha expuesto anteriormente, la disminución en la actividad biológica de una entidad biológicamente activa inmovilizada puede ser causada por una variedad de factores. Independientemente del mecanismo por el que se disminuye la actividad biológica de una entidad inmovilizada, la adición de una composición orgánica biológicamente compatible combinada de forma no covalente con la entidad biológicamente activa inmovilizada puede mantener la actividad biológica de la entidad durante y después de la esterilización, la manipulación mecánica, tal como la compactación y la expansión mecánicas, y/o el almacenamiento de las entidades.

La composición orgánica biológicamente compatible adicional comprende un glucosaminoglucano, dextrano, sulfato

de dextrano, polietilenglicol o glicerol y puede tener actividad biológica o no tener actividad biológica.

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

La realización preferida de la presente invención se refiere a un producto sanitario esterilizado para implantación, u otra localización, en un sitio anatómico. Los más preferidos son los productos sanitarios esterilizados para colocación dentro de una estructura anatómica que delimita un espacio vacío, o lumen, para reforzar la estructura anatómica o mantener el espacio vacío delimitado de este modo.

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

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

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

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

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

Ejemplos

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

(Artif. Organs 1991; 15: 281-491).

La actividad de unión a ATIII por área superficial de material de sustrato se define como el número de picomoles de ATIII unida por área superficial aparente del material de sustrato recubierto o no recubierto. El área superficial aparente del sustrato no tiene en cuenta las múltiples superficies recubiertas ni consideraciones de porosidad de un material de sustrato poroso. Si el material de sustrato es poroso, el efecto de la porosidad sobre el área superficial no se considera para estos cálculos. Por ejemplo, el área superficial aparente de un injerto vascular de ePTFE tubular cilíndrico (que está hecho de un material poroso) con heparina unida en el punto del extremo inmovilizada sobre el material de sustrato que comprende la superficie interior del injerto tubular se calcula como se hace para cualquier forma geométrica cilíndrica como $2\pi rL$: donde r es el radio interior del injerto; L es la longitud axial; y π es el número pi. Es importante señalar que la naturaleza porosa de ePTFE y su efecto sobre el área superficial no se tiene en cuenta aquí. Por consiguiente, los materiales de sustrato no poroso que se cortan en cuadrados para el ensayo se considera que tienen un área superficial igual a la longitud multiplicada por la anchura.

Los cálculos de la actividad de disulfato de dermatán sobre las superficies en la presente invención se realizaron utilizando el área superficial de un solo lado del material de muestra, aunque toda la muestra, incluyendo los intersticios, puede tener disulfato de dermatán inmovilizado sobre ella. La actividad de disulfato de dermatán se ensayó midiendo la aptitud, o capacidad, del disulfato de dermatán unido en el punto del extremo para unirse a una cantidad conocida de cofactor II de heparina (HCII). Los resultados se expresaron como picomoles de cofactor II de heparina (HCII) unido por centímetro cuadrado de material de sustrato (pmol de HCII/cm² de material de sustrato). Se cortan muestras de la construcción de un tamaño de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm²) y se ensayan en cuanto a la actividad de disulfato de dermatán midiendo la capacidad del sulfato de dermatán unido en el punto del extremo para unirse al cofactor II de heparina (HCII). La medida de la actividad de disulfato de dermatán es similar a la descrita previamente para la actividad de la heparina por Larsen M. L, et al. en "Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA" (S-2238) (Thromb. Res. 1978; 13: 285-288) y Pasche B., et al. en "A binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" (Artif. Organs 1991; 15: 281-491). Para el ensayo de la actividad de disulfato de dermatán, se deja que el HCII se una a la superficie con disulfato de dermatán, se eluye de la superficie por un exceso de disulfato de dermatán soluble, y se combina con trombina en un ensayo colorimétrico para determinación de la actividad de trombina. El ensayo determina indirectamente la cantidad de HCII presente midiendo la inhibición de la trombina humana mediada por HCII. La cantidad de HCII se determina a partir de una curva estándar derivada de la mezcla de cantidades conocidas de disulfato de dermatán, HCII, trombina y un sustrato de trombina sintética (conocido como un ensayo amidolítico). Un método similar para medir la actividad de disulfato de dermatán soluble ha sido descrito previamente por Dupouy D., et al., en "A simple method to measure dermatan sulfate at sub-microgram concentrations in plasma". Thromb. Haemost. 60: 236-239 (1988). Los resultados se expresan como la cantidad de HCII unido por unidad de área superficial del material de sustrato en picomoles por centímetro cuadrado (pmol/cm²). Todas las muestras se mantienen en condiciones de humedad a lo largo del ensayo. Es importante observar que, aunque las muestras de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm²) tienen cada una un área superficial total de dos centímetros cuadrados (2 cm²) si se consideran los dos lados del material, sólo se utiliza una superficie de la muestra (es decir, 1 cm²) para calcular la actividad de unión de disulfato de dermatán-HCII en pmol/cm².

En un método alternativo, la actividad de disulfato de dermatán se cuantifica directamente midiendo la cantidad de HCII radiomarcado unido a la construcción de disulfato de dermatán inmovilizado. Esta técnica es similar a los métodos descritos para medir la unión de antitrombina III a las construcciones de heparina inmovilizada por Du Y. J. et al., en "Protein adsorption on polyurethane catheters modified with a novel antithrombin-heparin covalent complex". J. Biomed. Mater. Res. 80A: 216-225 (2007). La construcción de disulfato de dermatán se incubó con una solución de HCII que ha sido marcado covalentemente con el radioisótopo yodo-125 (¹²⁵I). Después de la incubación, la superficie se lava repetidamente y la cantidad de radiación emitida desde la construcción se mide por un contador gamma. Puesto que se conoce la relación de la emisión a la masa de HCII, se puede determinar la cantidad de HCII. Los resultados se expresan como cantidad de HCII unido por unidad de área superficial del material de sustrato en picomoles por centímetro cuadrado (pmol/cm²).

La actividad de unión a HCII por área superficial del material de sustrato se define como el número de picomoles de HCII unido por área superficial aparente del material de sustrato recubierto o no recubierto. El área superficial aparente no tiene en cuenta las múltiples superficies recubiertas ni consideraciones de porosidad de un material de sustrato poroso. Si el material de sustrato es poroso, el efecto de la porosidad sobre el área superficial no se considera para estos cálculos. Por ejemplo, el área superficial aparente de un injerto vascular de ePTFE tubular cilíndrico (que está hecho de un material poroso) con disulfato de dermatán unido en el punto del extremo inmovilizado sobre el material de sustrato que comprende la superficie interior del injerto tubular se calcula como se hace para cualquier forma geométrica cilíndrica como $2\pi rL$: donde r es el radio interior del injerto; L es la longitud axial; y π es el número pi. Es importante señalar que la naturaleza porosa de ePTFE y su efecto sobre el área superficial no se tiene en cuenta aquí. Por consiguiente, los materiales de sustrato no poroso que se cortan en cuadrados para el ensayo se considera que tienen un área superficial igual a la longitud multiplicada por la anchura.

Ejemplo comparativo 1

Este ejemplo demuestra la retención de la actividad biológica de la heparina "neta" no unida después de la

exposición de la heparina a un proceso de esterilización con óxido de etileno (EtO).

En este ejemplo, se obtuvo heparina sódica de grado USP no esterilizada en forma de polvo liofilizado de Celsus Laboratories (Cincinnati, OH). Se pusieron cantidades medidas de heparina en bolsas de esterilización CHEX-ALL® (Long Island City, NY) para ensayo. Un grupo de bolsas que contienen heparina se expuso a la esterilización con EtO. La esterilización con óxido de etileno se realizó en condiciones de acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de exposición al gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h). Otro grupo se sometió al procedimiento de esterilización en ausencia de EtO. Un tercer grupo no se expuso al procedimiento de esterilización.

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

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

Ejemplo comparativo 2

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

De acuerdo con la patente de Estados Unidos N° 6.653.457, una composición de heparina modificada con aldehído preparada según la Patente de Estados Unidos N° 4.613.665, se unió en el punto del extremo a un material de recubrimiento, o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). Se incorporó una composición orgánica biológicamente compatible adicional dentro del material de recubrimiento y de la heparina unida para hacer posible que la heparina inmovilizada fuera sometida a esterilización con EtO sin pérdida significativa de actividad biológica.

Se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406). Se aplicó un material de recubrimiento en la forma de un recubrimiento de base al material de ePTFE montando el material sobre un bastidor de bordado de plástico de diez centímetros (10 cm) de diámetro y sumergiendo el material de ePTFE soportado primero en alcohol isopropílico (IPA) al 100 % durante aproximadamente cinco minutos (5 min) y después en una solución de polietileno-imina (PEI) LUPASOL® y alcohol isopropílico (IPA) en una relación uno a uno (1:1). La PEI libre de agua LUPASOL® se obtuvo de BASF y se diluyó a una concentración de aproximadamente cuatro por ciento (4 %) y se ajustó a pH 9,6. Después de la inmersión del material de ePTFE en la solución durante aproximadamente quince minutos (15 min), se separó el material de la solución y se enjuagó con agua desionizada (DI) a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). La PEI que queda sobre el material de ePTFE se reticuló con una solución acuosa al 0,05 % de glutaraldehído (obtenido de Amresco) a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Se añadió PEI adicional a la construcción colocando la construcción en una solución acuosa al 0,5 % de PEI a un pH de 9,6 durante quince minutos (15 min) y se enjuagó de nuevo con agua DI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). La imina formada como resultado de la reacción entre el glutaraldehído y la capa de PEI se reduce con una solución de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) (5 g disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,6) durante quince minutos (15 min) y se enjuaga con agua DI durante treinta minutos (30 min).

Se añadió una capa adicional de PEI a la construcción sumergiendo la construcción en solución acuosa al 0,05 % de

- 5 glutaraldehído a pH 9,6 durante quince minutos (15 min), seguido por inmersión en una solución acuosa al 0,5 % de PEI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Después, se enjuagó la construcción con agua DI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Las iminas resultantes se redujeron sumergiendo la construcción en una solución de NaCNBH₃ (5 g disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,6) durante quince minutos (15 min) seguido por un enjuague con agua DI durante treinta minutos (30 min). Se aplicó una tercera capa a la construcción mediante la repetición de estas etapas. El resultado fue un material de base fluoropolimérico hidrófobo poroso que tiene un recubrimiento base de polímero reticulado hidrófilo sobre sustancialmente todas las superficies expuestas e intersticiales del material de base.
- 10 Se unió una capa química intermedia a la capa base de polímero en la preparación para la colocación de otra capa de PEI sobre la construcción. La capa de carga iónica intermedia se preparó incubando la construcción en una solución de sulfato de dextrano (Amersham Pharmacia Biotech) y cloruro de sodio (0,15 g de sulfato de dextrano y 100 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3) a 60 °C durante noventa minutos (90 min) seguido por un enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min).
- 15 Se unió una capa de PEI, denominada en la presente memoria como una "capa límite" a la capa intermedia colocando la construcción en una solución acuosa al 0,3 % de PEI (pH 9) durante aproximadamente cuarenta y cinco minutos (45 min), seguido por un enjuague con una solución de cloruro de sodio (50 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI) durante veinte minutos (20 min). Se realizó un enjuague final con agua DI durante veinte minutos (20 min).
- 20 La heparina modificada con aldehído se unió o se conjugó en el punto del extremo, con la capa o capas de PEI mediante la colocación de la construcción en una solución salina de cloruro de sodio que contiene heparina (1,5 g de heparina, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 2,86 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ al dicho un litro (1 L) de la solución de heparina antes de añadir las muestras. Se enjuagaron entonces las muestras con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por la liofilización de toda la construcción para producir heparina seca unida al material de ePTFE. La presencia y la uniformidad de la heparina se determinó mediante la tinción de muestras de la construcción en ambos lados con azul de toluidina. La tinción produjo una superficie de color púrpura uniforme que indica que la heparina estaba presente y unida uniformemente al material de ePTFE.
- 25
- 30 Mediante la adición de compuestos o composiciones particulares a la construcción unida a heparina, se puede mantener la actividad biológica de la heparina después de la exposición a condiciones que de otro modo disminuirían la actividad biológica de la heparina. Las condiciones incluyen, pero no se limitan a, esterilización con EtO, compactación y expansión mecánicas, y almacenamiento.
- 35 Las construcciones descritas anteriormente recubiertas con un material de recubrimiento se expusieron a soluciones de los siguientes compuestos para evaluar el efecto estabilizante de los mismos sobre la actividad biológica de la heparina unida a partes del recubrimiento: cloruro de calcio grado USP (Fisher Scientific), heparina sódica grado USP (Celsus), polietilenglicol (peso molecular 20.000, Sigma), dextrano DEAE (peso molecular 500.000, PK Chemical), sal de sodio de sulfato de dextrano (peso molecular 8.000, Sigma), y dextrano (peso molecular 9.500, Sigma) a concentraciones de 0,5 g por 100 mL de agua DI ajustada a pH 9,6. Se utilizó también dexametasona a 0,5 g por 100 mL de etanol sin ajuste de pH. Cada una de estas soluciones se denomina en la presente memoria una "solución de tratamiento". El efecto de estos diferentes compuestos sobre la actividad de unión de la heparina a la antitrombina III (ATIII) después de esterilización con EtO se expresó como picomoles de antitrombina III unida por centímetro cuadrado (cm²) de material de sustrato. Estos datos se resumen en la Figura 9.
- 40
- 45 Para exponer una construcción particular que contiene heparina a una solución de tratamiento particular, se colocó la construcción en un vaso de precipitados de dos litros (2 L) y se añadieron cien mililitros (100 mL) de solución de tratamiento, suficientes para sumergir completamente la construcción en la solución de tratamiento. Cada construcción se expuso a la solución de tratamiento durante una hora (1 h) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se retiró la construcción de la solución y se liofilizó antes de la exposición a un procedimiento de esterilización.
- 50 En la preparación para la esterilización con EtO, cada construcción liofilizada se colocó y se selló en una bolsa autosellable Tower DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL). Se llevó a cabo la esterilización con óxido de etileno en condiciones de acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de exposición al gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).
- 55 Después de la esterilización con EtO, se retiró cada construcción (incluyendo los controles) de su bolsa y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se hizo un enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min).
- Se cortaron muestras de la construcción de un tamaño de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm²) y se

ensayaron en cuanto a la actividad de heparina midiendo la capacidad de la heparina unida en el punto del extremo para unirse a ATIII. El ensayo está descrito por Larsen M. L., et al. en "Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238)". *Thromb. Res.* 13: 285-288 (1978) y Pasche B., et al. en "A binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions". *Artif. Organs* 15: 281-491 (1991).

5 Los resultados se expresaron como la cantidad de ATIII unida por unidad de área superficial del material de sustrato en picomoles por centímetro cuadrado (pmol/cm^2). Todas las muestras se mantuvieron en condiciones de humedad durante todo el ensayo. Es importante señalar que, aunque las muestras de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) tienen cada una un área superficial total de dos centímetros cuadrados (2 cm^2) si se consideran los dos lados del material, sólo se utilizó una superficie de la muestra (es decir, 1 cm^2) para calcular la actividad de unión de la heparina a ATIII en pmol/cm^2 .

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

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

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

30 La influencia de las composiciones orgánicas biológicamente compatibles descritas antes combinadas de forma no covalente con la heparina inmovilizada y el material de recubrimiento sobre la actividad de unión a la antitrombina III después de la esterilización se resume en el siguiente párrafo. Cada composición orgánica biológicamente compatible fue enjuagada de cada construcción como se ha descrito antes, antes de determinar la actividad de unión a la antitrombina III.

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

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

Estos resultados demuestran la capacidad para mantener o aumentar, la actividad de unión a la antitrombina III de la heparina unida en el punto del extremo después de esterilización con EtO con una composición biológicamente compatible adecuada combinada de forma no covalente con la heparina inmovilizada y el material de recubrimiento.

Ejemplo comparativo 3

50 Este ejemplo describe la capacidad de una composición orgánica biológicamente compatible adicional para producir una alta actividad de unión a la antitrombina III (ATIII) de la heparina unida en el punto del extremo a un material de recubrimiento polimérico sobre un material de sustrato que es un componente de un producto sanitario implantable.

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

La endoprótesis VIABAHN® estaba constreñida dentro de un catéter de administración y requirió la retirada del

- catéter antes de inmovilizar la heparina sobre la misma. Cada dispositivo constreñido en un catéter fue retirado para ser procesado tirando de una cuerda de liberación unida a una vaina de constricción y liberando la vaina de alrededor del dispositivo. Una vez libre, cada dispositivo se expandió y se utilizó como un material de sustrato separado. Cada material de sustrato (dispositivo de endoprótesis) se sumergió en una solución de PEI (al 5 % en agua DI) e IPA (grado USP) en una relación en tanto por ciento en volumen de 30:70, respectivamente, durante aproximadamente doce horas (12 h) para colocar un material de recubrimiento polimérico (18) sobre el material de sustrato (12). El material de recubrimiento polimérico (18) tenía una multiplicidad de grupos químicos reactivos (16) a los cuales eventualmente se unía en el punto del extremo una pluralidad de moléculas de heparina (17) modificadas con aldehído.
- 5 Se colocó al menos una capa adicional de material de recubrimiento (18a, 18b) sobre la primera capa de PEI (18). Esto se realizó poniendo cada dispositivo endoprotésico dentro de un tubo separado de silicona y conectando el tubo a una bomba peristáltica y un depósito de solución. Esto permitió que una solución adicional que contiene un material de recubrimiento se hiciera pasar repetidamente a través del centro del producto sanitario tubular para cubrir principalmente las superficies interiores del dispositivo.
- 10 Con cada endoprótesis contenida dentro de uno de estos sistemas de flujo dinámico, se pasó a través del dispositivo un material de recubrimiento (18) en la forma de una solución acuosa al 0,10 % (pH 9,0) de PEI e IPA en una proporción en tanto por ciento en volumen de 45:55, respectivamente, durante aproximadamente veinte minutos (20 min). A continuación, cada dispositivo se enjuagó con agua DI (pH 9,0) durante cinco minutos (5 min) y las capas de PEI se reticularon (19) por exposición a una solución acuosa de glutaraldehído al 0,05 % (pH 9,0) durante veinte minutos (20 min). Los dispositivos se lavaron entonces de nuevo con una solución acuosa de PEI (0,10 %, pH 9,0) durante cinco minutos (5 min). Las iminas resultantes se redujeron con una solución de cianoborohidruro de sodio (5 g en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante quince minutos (15 min) y se enjuagaron con agua DI durante treinta minutos (30 min).
- 20 Se colocó una capa intermedia de carga iónica sobre la capa o capas de PEI reticuladas de cada dispositivo haciendo fluir una solución de sulfato de dextrano (0,15 g de sulfato de dextrano y cien gramos de cloruro de sodio (100 g de NaCl) disueltos en un litro (1 L) de agua DI, pH 3) a través del sistema de flujo dinámico y sobre la capa de PEI a sesenta grados centígrados (60 °C) durante aproximadamente noventa minutos (90 min). Esto fue seguido por enjuague del sistema con agua DI durante quince minutos (15 min).
- 25 Se añadió una capa "límite" (18b) de PEI a la capa de sulfato de dextrano cargado iónicamente (18a) haciendo fluir una solución acuosa de PEI (0,075 %, pH 9,0) a través del sistema de flujo dinámico durante aproximadamente cuarenta y cinco minutos (45 min) seguido de un enjuague con una solución de cloruro de sodio (50 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI) durante quince minutos (15 min). El enjuague fue seguido por una breve descarga de agua DI durante aproximadamente dos minutos y medio (2,5 min).
- 30 La heparina modificada con aldehído se unió o se conjugó en el punto del extremo, a la capa o capas de PEI colocando la construcción en una solución salina de cloruro de sodio que contiene heparina (1,5 g de heparina, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 2,86 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ a dicho litro (1 L) de la solución de heparina diez minutos (10 min) después de comenzar la etapa. Un primer enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min), fue seguido por un enjuague con una solución de ácido bórico (0,7 g de NaCl, 10,6 g de ácido bórico y 2,7 g de NaOH disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante aproximadamente veinte minutos (20 min), y un enjuague final con agua DI durante quince minutos (15 min). Después, se sometió la construcción a un proceso de liofilización. La tinción de muestras seleccionadas con azul de toluidina produjo una superficie de color púrpura consistente que indica heparina unida de manera uniforme.
- 35 Basándose en los resultados obtenidos en los estudios descritos en el Ejemplo 2, *supra*, se seleccionaron heparina de grado USP (sal de sodio) y sulfato de dextrano de peso molecular 8.000 (sal de sodio) a una concentración de 0,5 g/100 mL de agua DI (pH 9,6), como las composiciones orgánicas biológicamente compatibles preferidas para mantener, o estabilizar, la actividad de unión a la antitrombina III de la heparina inmovilizada durante y después de la esterilización con EtO.
- 40 Para cada composición orgánica biológicamente compatible preferida, se colocaron secciones de las endoprótesis que tienen heparina unida en el punto del extremo a un material de recubrimiento polimérico en tubos de plástico que contenían una solución de dichas composiciones orgánicas biológicamente compatibles (cada una a una concentración de 0,5 g/100 mL de agua DI, pH 9,6) y se incubaron a sesenta grados centígrados (60 °C) durante una hora (1 h). Cada muestra tratada se retiró del tubo de plástico y se expuso a un proceso de liofilización.
- 45 Cada muestra liofilizada se colocó en una bolsa autosellable individual Tower DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL) y se selló para esterilización con EtO. Se llevó a cabo la esterilización con óxido de etileno en condiciones de acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de exposición al gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).
- 50
- 55

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

- 5 Se cortaron muestras de material de sustrato de cada dispositivo esterilizado con EtO (aproximadamente 0,5 cm de largo) de cada dispositivo y la heparina inmovilizada se midió en cuanto a su actividad biológica utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron en condiciones de humedad durante el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de antitrombina III unida por unidad de superficie de material de sustrato (pmol/cm^2), medidos en la superficie luminal de cada dispositivo y no en toda el área superficial del dispositivo (es decir, ambas superficies abluminal y luminal).

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

20 Ejemplo comparativo 4

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

- 25 El material de recubrimiento utilizado como un recubrimiento de base en esta construcción fue elegido para obtener un material de cobertura, o recubrimiento que contiene heparina, que no tenía esencialmente ninguna carga iónica. Se utilizaron alcohol polivinílico y PEI como los materiales de recubrimiento.

30 De acuerdo con la patente de Estados Unidos N° 6.653.457, una composición de heparina modificada con aldehído se unió a un material de sustrato recubierto. El material de sustrato (12) era material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE). Se incorporó una composición química orgánica biocompatible adicional (100) al material de recubrimiento que contiene heparina (18) de la construcción, para hacer posible que la heparina se pueda someter a esterilización con EtO sin pérdida significativa de actividad biológica.

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

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

50 Un material de sustrato de ePTFE recubierto que tiene una multiplicidad de grupos químicos reactivos sobre el mismo, se sumergió en la solución de heparina (1,0 g de heparina, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante noventa minutos (90 min) a 60 °C. Se añadió un volumen de 2,86 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH_3 a dicho 1 L de la solución de heparina antes de iniciar esta etapa. Un primer enjuague de quince minutos (15 min) con agua DI, fue seguido por un enjuague con una solución acuosa de ácido bórico (0,7 g de NaCl, 10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante aproximadamente veinte minutos (20 min), y un enjuague final con agua DI durante quince minutos (15 min). Después, se sometió la construcción a un proceso de liofilización. Las muestras de la construcción se tiñeron con azul de toluidina. La tinción produjo una superficie de color púrpura consistente que indica heparina unida uniformemente sobre el material de ePTFE recubierto.

55

5 La construcción se expuso a una solución acuosa de tratamiento que contiene una composición orgánica biológicamente compatible (100) en forma de sulfato de dextrano de peso molecular 8.000 de grado USP (sal de sodio) (Sigma) mediante la inmersión de la construcción en 100 mL de solución de tratamiento (0,5 g de sulfato de dextrano/100 mL de agua DI, pH 9,6) a sesenta grados centígrados (60 °C) durante una hora (1 h). Después de la retirada de la construcción de la solución de tratamiento, se liofilizó la construcción.

10 Cada muestra liofilizada se puso en una bolsa autosellable Tower DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL) para esterilización con EtO. Se llevó a cabo la esterilización con óxido de etileno en condiciones de acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de exposición al gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

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

15 Se cortaron muestras de la membrana (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto del extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a actividad de unión a la antitrombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron en condiciones de humedad durante todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de antitrombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm² de material de sustrato).

20 La Figura 11 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de una composición orgánica biológicamente compatible en la forma de sulfato de dextrano sobre la actividad de unión a la antitrombina III de la heparina unida en el punto del extremo inmovilizada sobre un material de sustrato de politetrafluoroetileno expandido poroso y un material de recubrimiento de alcohol polivinílico y PEI, después de la esterilización con EtO. La actividad biológica de la heparina inmovilizada se expresó como picomoles de antitrombina III unida por centímetro cuadrado de material de sustrato.

25 Las muestras de control no esterilizadas tenían una actividad de unión a la antitrombina III de 150 pmol/cm² de material de sustrato. Las muestras de control esterilizadas tenían una actividad de unión a la antitrombina III de 93 pmol/cm² de material de sustrato. Las muestras esterilizadas con óxido de etileno tratadas con sulfato de dextrano tenían una actividad de unión a la antitrombina III de 115 pmol/cm² de material de sustrato. Este valor era mayor que los valores de control para los dispositivos esterilizados con EtO que no fueron expuestos a una solución de tratamiento de sulfato de dextrano (esto es, 93 pmol/cm² de material de sustrato), lo que indica que el sulfato de dextrano añadido aumentó la actividad biológica de la heparina inmovilizada después de esterilización con EtO. Estas dos construcciones tenían valores de actividad de unión a la antitrombina III que fueron significativamente más bajos que los controles no tratados, no esterilizados con EtO, (150 pmol/cm² de material de sustrato).

30 Como se ve por los resultados, el sulfato de dextrano tuvo un impacto significativo sobre la actividad de unión a la antitrombina III de la heparina inmovilizada unida a una construcción con un material de recubrimiento polimérico que incluye una primera capa de recubrimiento iónicamente neutra, después de la esterilización con EtO. Todas las barras representan valores medios de n = 3 muestras.

Ejemplo comparativo 5

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

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

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

55 Cada endoprótesis cilíndrica se puso sobre un sistema de administración intravascular y se comprimió mecánicamente hasta que estuvo suficientemente compactada sobre el sistema de administración para ser

contenida con una funda de constricción. Los dispositivos hechos de acuerdo con el Ejemplo 3 pueden resistir las tensiones mecánicas asociadas con la compactación de la endoprótesis sobre el sistema de administración sin pérdida significativa en la actividad de la heparina incorporada en el recubrimiento.

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

10 Para comprimir y compactar los dispositivos endoluminales sobre un sistema de administración, se tiró de cada endoprótesis a través de un embudo estrecho con un diámetro fijo. Cada endoprótesis tenía seis (6) puntos de sutura (Gore-Tex® CV-O, 0N05) cosidos a través de un extremo para arrastrar los dispositivos a través del embudo. Se tiró de cada dispositivo a través de la abertura de la punta de una pipeta de veinticinco mililitros (25 mL) (Falcon® producto n° 357525) con un diámetro de aproximadamente tres milímetros (3 mm) y dentro de un tubo de vidrio con un diámetro de aproximadamente 3,1 mm para mantenerlo en estado compactado.

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

20 Se cortaron muestras de material que contiene heparina de cada endoprótesis (aproximadamente 0,5 cm de largo) y se midió la heparina unida en cuanto a la actividad biológica utilizando el ensayo de unión a la antitrombina III (ATIII) descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron en condiciones de humedad durante todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como unión a la antitrombina III por unidad de área superficial de sustrato ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ de material de sustrato).

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

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

Ejemplo comparativo 6

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

45 El producto sanitario implantable utilizado en este ejemplo se construyó de la misma manera que se describe en el Ejemplo 3. El dispositivo estaba en la forma de un tubo reforzado de alambre de nitinol hecho de un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) poroso, obtenido de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ bajo el nombre comercial de endoprótesis VIABAHN®. El dispositivo tubular tenía quince centímetros (15 cm) de largo y seis milímetros (6 mm) de diámetro. Se utilizó el mismo procedimiento que se detalla en el Ejemplo 3 para formar un recubrimiento que contiene heparina sobre el dispositivo.

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

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

Los materiales de sustrato recubierto con heparina inmovilizada que no recibieron las composiciones orgánicas de glicerol y heparina biológicamente compatibles adicionales y que fueron expuestos a la esterilización con EtO y que fueron compactados y expandidos diametralmente mostraron una reducción significativa en la actividad de unión a la antitrombina III (63 pmol/cm^2) en comparación con los materiales de control construidos y tratados similarmente no sometidos a esterilización con EtO ni a compactación y expansión diametrales (158 pmol/cm^2). Cuando los materiales de sustrato recubierto de heparina inmovilizada se trataron con una composición orgánica de glicerol y heparina biológicamente compatible y se expusieron a las mismas condiciones de esterilización con EtO y manipulaciones mecánicas que la construcción no tratada, la actividad de unión a la antitrombina III de la heparina inmovilizada se mantuvo similar a la de los materiales de control (147 pmol/cm^2).

Ejemplo comparativo 7

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

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

Ejemplo comparativo 8

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

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

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

En la preparación para la esterilización con EtO, cada construcción liofilizada se colocó y se selló en una bolsa autosellable Tower DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo bajo condiciones de acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de exposición al gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna a cincuenta y cinco grados centígrados ($55 \text{ }^\circ\text{C}$), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

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

Se cortaron muestras de la membrana (aproximadamente 1 cm^2) con heparina unida en el punto del extremo, de la construcción esterilizada y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a su actividad de unión a la antitrombina III

utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Se mantuvieron las muestras en condiciones de humedad durante todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de antitrombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm^2).

- 5 La muestra tratada con bacitracina y posteriormente esterilizada con óxido de etileno tuvo una actividad de unión a la antitrombina III de $9 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ ($n = 3$).

Ejemplo comparativo 9

- 10 Este ejemplo describe la adición de una composición orgánica biológicamente compatible a la heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato cubierto, o recubierto, y previamente expuesto a esterilización con EtO. Se seleccionó un agente antibiótico peptídico como la composición orgánica biológicamente compatible en este ejemplo. Una construcción tratada de esta manera tenía una unión significativa de ATIII a la heparina después de la exposición a la esterilización con EtO.

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

- 15 En la preparación para la esterilización con EtO, cada construcción liofilizada se colocó y se selló en una bolsa autosellable Tower DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL). La esterilización con óxido de etileno se llevó a cabo en condiciones de acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de exposición al gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna a cincuenta y cinco grados centígrados ($55 \text{ }^\circ\text{C}$), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

- 20 Después de la esterilización con EtO, la construcción se manipuló de forma aséptica en una cabina de seguridad biológica NUAIRE, clase II, tipo A/B3, modelo NU-425-600 (Plymouth, MN).

- 25 Se cortaron de la construcción muestras esterilizadas de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) de tamaño y se sumergieron en una solución de bacitracina esterilizada por filtración ($649,4 \text{ mg}$ a 77000 unidades/g disueltos en 10 mL de solución de irrigación de cloruro de sodio al $0,9 \%$ comprados de Hospira, Inc.) con una concentración resultante de aproximadamente cinco mil (5000) unidades por mL de solución de irrigación de cloruro de sodio al $0,9 \%$ de grado USP. Las muestras se expusieron a la solución de bacitracina durante dos minutos (2 min) a temperatura ambiente.

- 30 Se retiraron las muestras de la solución y se lavaron con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato ($10,6 \text{ g}$ de ácido bórico, $2,7 \text{ g}$ de NaOH y $0,7 \text{ g}$ de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, $\text{pH } 9,0$) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se hizo un enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min).

- 35 Se cortaron muestras del material en lámina (aproximadamente 1 cm^2) con heparina unida en el punto del extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a actividad de unión a la antitrombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron en condiciones de humedad durante todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de antitrombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm^2).

La muestra que fue esterilizada inicialmente con óxido de etileno y posteriormente tratada con bacitracina tenía una actividad de unión a la antitrombina III de $185 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ ($n = 3$). Como indican estos resultados, un agente terapéutico se puede mezclar con heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto después de que la entidad ha sido esterilizada sin reducir significativamente su actividad biológica.

- 40 Ejemplo comparativo 10

Este ejemplo demuestra heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto que se mezcló con una composición orgánica biológicamente compatible, se esterilizó con EtO, y finalmente se trató con un agente antibiótico peptídico. Una construcción tratada de esta manera tiene una unión significativa de heparina a ATIII.

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

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

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

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

- 5 Después de la esterilización con EtO, la construcción se manipuló de forma aséptica en una cabina de seguridad biológica NUAIRE, clase II, tipo A/B3, modelo NU-425-600 (Plymouth, MN).

10 Se cortaron de la construcción muestras esterilizadas de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm²) de tamaño y se sumergieron en una solución de bacitracina esterilizada por filtración (649,4 mg a 77000 unidades/g disueltos en 10 mL de solución de irrigación de cloruro de sodio al 0,9 %) con una concentración resultante de aproximadamente cinco mil (5000) unidades por mL de solución de irrigación de cloruro de sodio al 0,9 % de grado USP. Las muestras se expusieron a la solución de bacitracina durante dos minutos (2 min) a temperatura ambiente.

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

15 Se cortaron muestras de la membrana (aproximadamente 1 cm²) con heparina unida en el punto del extremo y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a actividad de unión a la antitrombina III utilizando el ensayo de unión a ATIII descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las muestras se mantuvieron en condiciones de humedad durante todo el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresaron como picomoles de antitrombina III unida por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm²).

20 La muestra que fue inicialmente tratada con polietilenglicol, esterilizada con óxido de etileno y después tratada con bacitracina tenía una actividad de unión a la antitrombina III de 195 pmol/cm² (n = 3). Por lo tanto, un material de sustrato recubierto esterilizado con una heparina biológicamente activa inmovilizada sobre el mismo y una primera composición orgánica biológicamente compatible (PEG) mezclada con el mismo, puede ser tratado adicionalmente con una segunda composición orgánica biológicamente compatible (bacitracina) después de la esterilización con EtO y puede retener una actividad significativa de unión a ATIII.

Ejemplo comparativo 11

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

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

40 La construcción descrita anteriormente recubierta con un material de recubrimiento se expuso a una solución de dextrano (peso molecular 40.000, Pierce) activado con aldehído (0,050 g de dextrano activado con aldehído, 2,93 g de NaCl disueltos en 100 mL de agua DI, pH 5,5) durante cien veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 0.286 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ a los cien mililitros (100 mL) de solución de dextrano activado con aldehído antes de añadir la muestra.

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

50 En la preparación para la esterilización con EtO, la construcción liofilizada se puso y se selló en una bolsa autosellable Convertors® (Cardinal Health, McGaw Park, IL). Se llevó a cabo la esterilización con óxido de etileno en condiciones de acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de exposición al gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna a cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

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

55 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de

65 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que una composición orgánica biocompatible se puede unir covalentemente, además de la heparina unida covalentemente en el punto del extremo, a la capa de recubrimiento a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina después de la esterilización con EtO.

Ejemplo comparativo 12

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

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

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

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

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

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

35 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 96 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que una composición orgánica biocompatible se puede unir covalentemente, además de la heparina unida covalentemente en el punto del extremo, a la capa de recubrimiento a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina.

Ejemplo comparativo 13

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

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

50 La construcción descrita anteriormente recubierta con un material de recubrimiento se expuso a una solución de PEG activado con aldehído (peso molecular 5000, Nanocs) (0,20 g de PEG, 3,90 g de NaCl disueltos en 133 mL de agua DI, pH 5,5) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añadió un volumen de 0,380 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ a los cien mililitros (100 mL) de solución de PEG antes de añadir la muestra.

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

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

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

10 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 64 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que una composición orgánica biocompatible se puede unir covalentemente, además de la heparina unida covalentemente en el punto del extremo, a la capa de recubrimiento a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina.

Ejemplo comparativo 14

15 Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento, o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) seguido por la posterior unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (heparina USP activada con EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida)) al material de recubrimiento. Esta composición se expuso a esterilización con EtO y después se demostró una actividad biológica significativa de la heparina.

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

25 Se unió o se conjugó heparina grado USP a la capa o capas de PEI que ya contienen heparina unida en el punto del extremo mediante la colocación de la construcción en una solución salina de cloruro de sodio que contiene heparina grado USP (1,5 g de heparina USP, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Las construcciones se transfirieron a una solución 0,1 M de MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico] solución salina tamponada BupH™ MES (Pierce), 1,5 g de heparina USP, 29,3 g de NaCl, 0,20 g de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), y 0,13 g de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) disueltos en 1 L de agua DI, a pH 5,5 durante 4 horas (4 h) a temperatura ambiente.

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

35 En la preparación para la esterilización con EtO, la construcción liofilizada se colocó y se selló en una bolsa autosellable Convertors® (Cardinal Health, McGaw Park, IL). Se realizó la esterilización con óxido de etileno en condiciones de acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de permanencia de gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

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

45 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 31 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que una composición orgánica biocompatible se puede unir covalentemente, además de la heparina unida covalentemente en el punto del extremo, a la capa de recubrimiento a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina.

Ejemplo comparativo 15

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

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

- 5 Se transfirieron las membranas a una solución 0,1 M de MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico] solución salina tamponada BupH™ MES (Pierce), 29,3 g de NaCl, 0,20 g de hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), y 0,13 g de N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) disueltos en 1 L de agua DI, a pH 5,5 durante 4 horas (4 h) a temperatura ambiente.

- 10 Se retiró la construcción de la solución descrita anteriormente y se lavó con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1000 mL de agua DI, pH 9.0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se hizo un enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido de liofilización de toda la construcción para producir heparina seca unida al material de ePTFE.

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

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

- 25 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 20 pmol/cm² (n = 3). Este ejemplo demuestra que la heparina se puede unir además covalentemente a una capa de recubrimiento, en adición a la unión covalente en el punto del extremo, a la vez que se mantiene una actividad significativa de la heparina después de esterilización con EtO.

Ejemplo comparativo 16

- 30 Este ejemplo describe el uso de un agente antibiótico peptídico como una composición orgánica biológicamente compatible juntamente con heparina biológicamente activa que se inmoviliza en un material de sustrato recubierto. La construcción tuvo una actividad significativa de unión a ATIII después de la compactación y la expansión mecánicas.

- 35 En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. Se aplicó entonces la bacitracina utilizando condiciones sustancialmente equivalentes a las descritas en el Ejemplo 8. Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron mecánicamente, se expandieron mecánicamente, se lavaron, se cortaron para ensayo, y se ensayaron en cuanto a la unión a ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la que se describe en el Ejemplo 5.

La muestra tratada con bacitracina y posteriormente compactada y expandida tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 234 pmol/cm² (n=3).

- 40 Ejemplo comparativo 17

- 45 Este ejemplo describe la adición de una composición orgánica biológicamente compatible a la heparina biológicamente activa que se inmoviliza en un material de sustrato recubierto y que previamente es compactada y expandida. Se seleccionó un agente antibiótico peptídico como la composición orgánica biológicamente compatible. La construcción tratada de esta manera tuvo una unión significativa de ATIII a heparina después de la compactación y la expansión.

- 50 En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales fueron heparinizados utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3 y fueron compactados y expandidos mecánicamente de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5. La prótesis endoluminal se trató después con bacitracina y se lavó de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 9. Las prótesis endoluminales heparinizadas se cortaron después para ensayo y se ensayaron en cuanto a la unión de ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

La muestra heparinizada que fue compactada y expandida, seguido por la adición de bacitracina, tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 207 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 18

5 Este ejemplo describe heparina biológicamente activa inmovilizada sobre un material de sustrato recubierto. Se mezcló la heparina biológicamente activa inmovilizada con una composición orgánica biológicamente compatible, se compactó mecánicamente, se expandió mecánicamente, y se trató con un agente antibiótico peptídico. La construcción tratada de esta manera tenía una unión significativa de ATIII a heparina después de la exposición a la manipulación mecánica.

Las prótesis endoluminales se trataron y se ensayaron como se describe en el Ejemplo 17 con una excepción; el polietilenglicol se mezcló con la prótesis endoluminal heparinizada, tal como se describe en el Ejemplo 10, antes de la compactación y expansión de una manera sustancialmente equivalente a la del Ejemplo 5.

10 Una muestra heparinizada mezclada con una composición orgánica biológicamente compatible que fue compactada y expandida, seguido por la adición de bacitracina, tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 215 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 19

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

20 En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. El dextrano activado con aldehído se inmovilizó en la capa de recubrimiento de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 11. Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron mecánicamente, se expandieron mecánicamente, se cortaron para ensayo, y se ensayaron en cuanto a la unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

25 La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 155 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 20

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

35 En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. El polietilenglicol activado con aldehído se inmovilizó a la capa de recubrimiento de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 12. Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron, se expandieron, se cortaron para ensayo, y se ensayaron en cuanto la unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 221 pmol/cm² (n= 3).

40 Ejemplo comparativo 21

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

50 En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al descrito en el Ejemplo 3. El polietilenglicol activado con aldehído se inmovilizó en la capa de recubrimiento de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 13. Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron, se expandieron, se cortaron para ensayo, y se ensayaron en cuanto la unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 210 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 22

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

En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. La heparina USP se inmovilizó sobre la capa de recubrimiento de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 14. Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron, se expandieron, se cortaron para ensayo, y se ensayaron en cuanto la unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 155 pmol/cm^2 (n= 3).

Ejemplo comparativo 23

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

En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. La unión covalente posterior de la heparina inmovilizada sobre la capa de recubrimiento se realizó de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 15. Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron mecánicamente, se expandieron mecánicamente, se cortaron para ensayo, y se ensayaron en cuanto la unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 140 pmol/cm^2 (n= 3).

Ejemplo comparativo 24

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

En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. La heparina modificada con aldehído adicional se unió en el punto del extremo a la capa de recubrimiento mediante un enlace covalente lábil colocando la construcción en una solución salina de cloruro de sodio que contiene heparina (1,5 g de heparina modificada con aldehído, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Es importante tener en cuenta que el agente reductor, NaCNBH_3 , no se añadió durante esta segunda conjugación de heparina modificada con aldehído. El enlace formado entre aminas primarias y aldehídos, cuando se deja en el estado no reducido, es lábil. Las muestras se lavaron entonces con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por la liofilización de toda la construcción que produjo heparina seca unida al material de ePTFE.

Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5 y se esterilizaron como se describe en el Ejemplo 3. Después, se expandieron, se cortaron para ensayo, y se ensayaron en cuanto a la unión de ATIII como se describe en el Ejemplo 5.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tenían una actividad de unión a la antitrombina III de 31 pmol/cm^2 (n= 3).

Ejemplo comparativo 25

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

En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. La heparina modificada con aldehído adicional se unió en el punto del extremo a la capa de recubrimiento mediante un enlace covalente lábil colocando la construcción en una solución salina de cloruro de sodio que contiene heparina (1,5 g de heparina modificada con aldehído, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Es importante tener en cuenta que el agente reductor, NaCNBH₃, no se añadió durante esta segunda conjugación de heparina modificada con aldehído. El enlace formado entre aminas primarias y aldehídos, cuando se deja en el estado no reducido, es lábil. Las muestras se lavaron entonces con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de toda la construcción para producir heparina seca unida al material de ePTFE.

Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron, se expandieron, se cortaron para ensayo, y se ensayaron en cuanto a la unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tenían una actividad media de unión a la antitrombina III de 195 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 26

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento, o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), seguido por la unión adicional de una composición orgánica biológicamente compatible por medio de un enlace lábil al material de recubrimiento. El enlace lábil permite la administración local de un compuesto terapéutico a la vez que la heparina unida de forma estable retiene una actividad significativa de unión a ATIII después de la esterilización con EtO.

En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y fue provisto de un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 2. La heparina modificada con aldehído adicional se unió en el punto del extremo a la capa de recubrimiento mediante un enlace covalente lábil colocando la construcción en una solución salina de cloruro de sodio que contiene heparina (1,5 g de heparina modificada con aldehído, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Es importante tener en cuenta que el agente reductor, NaCNBH₃, no se añadió durante esta segunda conjugación de heparina modificada con aldehído. El enlace formado entre aminas primarias y aldehídos, cuando se deja en el estado no reducido, es lábil. Las muestras se lavaron entonces con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de toda la construcción para producir heparina seca unida al material de ePTFE.

Después, el material heparinado se esterilizó, se cortó para ensayo, y se ensayó en cuanto a la unión de ATIII como se describe en el Ejemplo 2.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tenían una actividad media de unión a la antitrombina III de 108 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 27

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), seguido por la posterior unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (polietilenglicol activado con aldehído) al material de recubrimiento, con la adición final de una composición orgánica biológicamente compatible (bacitracina) mezclada de forma no covalente. Esta composición se expuso a la esterilización con EtO y después de ella demostró una actividad biológica significativa de la heparina.

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

aldehído (peso molecular 1000) se unió covalentemente al material de recubrimiento de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 12 y después se mezcló bacitracina no covalentemente con esta composición como se describe en el Ejemplo 8. Después, se esterilizó la composición y se tomaron muestras como se describe en el Ejemplo 8 y se midió la heparina inmovilizada en cuanto a actividad de unión a la antitrombina III utilizando el ensayo de unión de ATIII descrito en el Ejemplo 2.

5

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tenían una actividad media de unión a la antitrombina III de 126 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 28

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

10

En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. El polietilenglicol activado con aldehído (peso molecular 1000) se unió covalentemente al material de recubrimiento de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 12 y se mezcló entonces bacitracina no covalentemente con esta composición como se describe en el Ejemplo 8. Después, las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron mecánicamente, se expandieron mecánicamente, se cortaron para ensayo, se lavaron y se ensayaron en cuanto a unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

15

20

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 249 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 29

Este ejemplo demuestra la unión covalente de heparina biológicamente activa a un material de recubrimiento colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), seguido por la posterior unión covalente de una composición orgánica biológicamente compatible (dextrano activado con aldehído) al material de recubrimiento, con la adición final de una composición orgánica biológicamente compatible (dexametasona) mezclada de forma no covalente. Esta composición se expuso a la esterilización con EtO y después de ella demostró una actividad biológica significativa de la heparina.

25

30

En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y fue provisto de un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 2. Se unió covalentemente dextrano activado con aldehído al material de recubrimiento de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 11 y se mezcló entonces dexametasona no covalentemente con esta composición que se esterilizó después y se muestreó como se describe en el Ejemplo 2. La heparina inmovilizada se midió en cuanto a actividad de unión a la antitrombina III utilizando el ensayo de unión de ATIII descrito en el Ejemplo 2.

35

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tenían una actividad media de unión a la antitrombina III de 77 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 30

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

45

En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. Se unió covalentemente dextrano activado con aldehído al material de recubrimiento de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 11 y se mezcló entonces la dexametasona no covalentemente con esta composición como se describe en el Ejemplo 2. Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron entonces mecánicamente, se expandieron mecánicamente, se cortaron para ensayo, se lavaron, y se ensayaron en cuanto a la unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

50

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tenían una actividad media de unión a la antitrombina III de 197 pmol/cm² (n= 3).

55

Ejemplo comparativo 31

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

En este ejemplo, se obtuvo un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406) y fue provisto de un recubrimiento que contiene heparina utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 2. Se unió polietilenglicol modificado con aldehído (peso molecular 1000) a la capa de recubrimiento mediante un enlace covalente lábil utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al descrito en el Ejemplo 12 excluyendo la adición de NaCNBH₃. Es importante tener en cuenta que no se añadió el agente reductor, NaCNBH₃, durante la conjugación del polietilenglicol modificado con aldehído. El enlace formado entre las aminas primarias y aldehídos, cuando se deja en el estado no reducido, es lábil. Las muestras se lavaron entonces con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de toda la construcción para producir heparina seca y polietilenglicol unidos al material de ePTFE. Se mezcló entonces de manera no covalente dexametasona con esta composición como se describe en el Ejemplo 2. Después, el material heparinizado se esterilizó, se muestreó, y se midió la actividad de unión a la antitrombina III utilizando el ensayo de unión de ATIII descrito en el Ejemplo 2.

Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tenían una actividad media de unión a la antitrombina III de 114 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo comparativo 32

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

En este ejemplo, los productos sanitarios implantables en la forma de prótesis endoluminales se heparinizaron utilizando un procedimiento sustancialmente equivalente al Ejemplo 3. El polietilenglicol modificado con aldehído (peso molecular 1000) se unió a la capa de recubrimiento mediante un enlace covalente lábil de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 12 excluyendo la adición de NaCNBH₃. Es importante tener en cuenta que no se añadió el agente reductor, NaCNBH₃, durante la conjugación del polietilenglicol modificado con aldehído. El enlace formado entre las aminas primarias y aldehídos, cuando se deja en el estado no reducido, es lábil. Las muestras se lavaron entonces con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por liofilización de toda la construcción para producir heparina seca y polietilenglicol unidos al material de ePTFE. Se mezcló entonces de manera no covalente dexametasona con esta composición como se describe en el Ejemplo 2. Las prótesis endoluminales heparinizadas se compactaron entonces mecánicamente, se expandieron mecánicamente, se cortaron para ensayo, se lavaron, y se ensayaron en cuanto a la unión de ATIII de una manera sustancialmente equivalente a la descrita en el Ejemplo 5.

La muestra preparada como se describe en este ejemplo tuvo una actividad media de unión a la antitrombina III de 188 pmol/cm² (n= 3).

Ejemplo 33

Este ejemplo describe la síntesis y la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), con actividad de unión a HCII.

Se produce disulfato de dermatán según la patente de Estados Unidos N° 5.922.690. Este material se procesa posteriormente según la patente de Estados Unidos N° 6.653.457, para producir una composición de disulfato de dermatán modificado con aldehído preparada según la patente de Estados Unidos N° 4.613.665, para unirla a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE).

Se obtiene un material de ePTFE en forma de lámina de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ bajo la marca comercial GORE™ Microfiltration Media (GMM-406). Se aplica un material de recubrimiento en la forma de un

- recubrimiento base al material de ePTFE montando el material sobre un bastidor de bordado de plástico de diez centímetros (10 cm) de diámetro y sumergiendo el material de ePTFE soportado primero en alcohol isopropílico (IPA) al 100 % durante aproximadamente cinco minutos (5 min) y después en una solución de polietileno-imina (PEI) LUPASOL® y alcohol isopropílico (IPA) en una relación uno a uno (1:1). La PEI libre de agua LUPASOL® se obtiene de BASF y se diluye a una concentración de aproximadamente cuatro por ciento (4 %) y se ajusta a pH 9,6. Después de la inmersión del material de ePTFE en la solución durante aproximadamente quince minutos (15 min), se separa el material de la solución y se lava con agua desionizada (DI) a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). La PEI que permanece sobre el material de ePTFE se reticula con una solución acuosa al 0,05 % de glutaraldehído (obtenido de Amresco) a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Se añade PEI adicional a la construcción colocando la construcción en una solución acuosa al 0,5 % de PEI a un pH de 9,6 durante quince minutos (15 min) y lavando de nuevo con agua DI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). La imina formada como resultado de la reacción entre el glutaraldehído y la capa de PEI se reduce con una solución de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3) (5 g disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,6) durante quince minutos (15 min) y se lava con agua DI durante treinta minutos (30 min).
- Se añade una capa adicional de PEI a la construcción sumergiendo la construcción en solución acuosa de glutaraldehído al 0,05 % a pH 9,6 durante quince minutos (15 min), seguido por inmersión en una solución acuosa al 0,5 % de PEI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Después, se enjuaga la construcción con agua DI a pH 9,6 durante quince minutos (15 min). Las iminas resultantes se reducen sumergiendo la construcción en una solución de NaCNBH_3 (5 g disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,6) durante quince minutos (15 min) seguido de un enjuague con agua DI durante treinta minutos (30 min). Se aplica una tercera capa a la construcción mediante la repetición de estas etapas. El resultado es un material de base fluoropolimérico hidrófobo poroso que tiene un recubrimiento base de polímero reticulado hidrófilo sobre sustancialmente todas las superficies expuestas e intersticiales del material de base.
- Se une una capa química intermedia a la capa base de polímero en preparación para la colocación de otra capa de PEI sobre la construcción. La capa de carga iónica intermedia se hace incubando la construcción en una solución de sulfato de dextrano (Amersham Pharmacia Biotech) y cloruro de sodio (0,15 g de sulfato de dextrano y 100 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3) a 60 °C durante noventa minutos (90 min) seguido por un enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min).
- Se une una capa de PEI, denominada en la presente memoria como una "capa límite" a la capa intermedia colocando la construcción en una solución acuosa al 0,3 % de PEI (pH 9) durante aproximadamente cuarenta y cinco minutos (45 min). seguido por un enjuague con una solución de cloruro de sodio (50 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI) durante veinte minutos (20 min). Se realiza un enjuague final con agua DI durante veinte minutos (20 min).
- El disulfato de dermatán modificado con aldehído se une o se conjuga a la capa o capas de PEI colocando la construcción en una solución salina de cloruro de sodio que contiene disulfato de dermatán (1,5 g de disulfato de dermatán, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añade un volumen de 2,86 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH_3 al dicho un litro (1 L) de la solución de disulfato de dermatán antes de añadir las muestras. Las muestras se enjuagan entonces con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por la liofilización de toda la construcción para producir disulfato de dermatán seco unido al material de ePTFE. La presencia y la uniformidad del disulfato de dermatán se determina mediante la tinción de muestras de la construcción en ambos lados con azul de toluidina. La tinción produce una superficie de color púrpura uniforme que indica que el disulfato de dermatán está presente y unido uniformemente al material de ePTFE.
- Se cortan muestras de la construcción de un tamaño de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) y se ensayan en cuanto a la actividad de disulfato de dermatán midiendo la capacidad del sulfato de dermatán unido en el punto del extremo para unirse al HCII. Los cálculos de la actividad de disulfato de dermatán sobre las superficies en la presente invención se realizaron utilizando el área superficial de un solo lado del material de muestra, aunque toda la muestra, incluyendo los intersticios, puede tener disulfato de dermatán inmovilizado sobre ella. La actividad de disulfato de dermatán se ensaya midiendo la aptitud, o capacidad, del disulfato de dermatán unido en el punto del extremo para unirse a una cantidad conocida de cofactor II de heparina (HCII). Los resultados se expresan como picomoles de cofactor II de heparina (HCII) unido por centímetro cuadrado de material de sustrato (pmol de HCII/cm^2 de material de sustrato). Se cortan muestras de la construcción de un tamaño de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) y se ensayan en cuanto a la actividad de disulfato de dermatán midiendo la capacidad de disulfato de dermatán unido en el punto del extremo para unirse al cofactor II de heparina (HCII). La medida de la actividad de disulfato de dermatán es similar a la descrita previamente para la actividad de la heparina por Larsen M. L, et al. en "Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA" (S-2238) (Thromb. Res. 1978; 13: 285-288) y Pasche B., et al. en "A binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" (Artif. Organs 1991; 15: 281-491). Para el ensayo de la actividad de disulfato de dermatán, se deja que se una HCII a la superficie de disulfato de dermatán, se eluye de la superficie mediante un exceso de disulfato de dermatán soluble, y se combina con trombina en un ensayo colorimétrico de la actividad de trombina. El ensayo

determina indirectamente la cantidad de HCII presente midiendo la inhibición mediada por HCII de la trombina humana. La cantidad de HCII se determina a partir de una curva estándar derivada mezclando cantidades conocidas de disulfato de dermatán, HCII, trombina y un sustrato de trombina sintético (conocido como un ensayo amidolítico). Un método similar para medir la actividad de disulfato de dermatán soluble ha sido descrito previamente por Dupouy D., et al., en "A simple method to measure dermatan sulfate at sub-microgram concentrations in plasma". *Thromb. Haemost.* 60: 236-239 (1988). Los resultados se expresan como la cantidad de HCII unido por unidad de área superficial del material de sustrato en picomoles por centímetro cuadrado (pmol/cm^2). Todas las muestras se mantienen en condiciones de humedad a lo largo del ensayo. Es importante observar que, aunque las muestras de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) tienen cada una un área superficial total de dos centímetros cuadrados (2 cm^2) si se consideran los dos lados del material, sólo se utiliza una superficie de la muestra (es decir, 1 cm^2) para calcular la actividad de unión de disulfato de dermatán-HCII en pmol/cm^2 .

En un método alternativo, la actividad de disulfato de dermatán se cuantifica directamente midiendo la cantidad de HCII radiomarcado unido a la construcción de disulfato de dermatán inmovilizado. Esta técnica es similar a los métodos descritos para medir la unión de antitrombina III a las construcciones de heparina inmovilizada por Du Y. J. et al., en "Protein adsorption on polyurethane catheters modified with a novel antithrombin-heparin covalent complex". *J. Biomed. Mater. Res.* 80A: 216-225 (2007). La construcción de disulfato de dermatán se incuba con una solución de HCII que ha sido marcada covalentemente con el radioisótopo yodo-125 (^{125}I). Después de la incubación, la superficie se lava repetidamente y la cantidad de radiación emitida desde la construcción se mide por un contador gamma. Puesto que se conoce la relación de la emisión a la masa de HCII, se puede determinar la cantidad de HCII. Los resultados se expresan como cantidad de HCII unido por unidad de área superficial del material de sustrato en picomoles por centímetro cuadrado (pmol/cm^2).

La actividad de unión de HCII por área superficial del material de sustrato se define como el número de picomoles de HCII unido por área superficial aparente del material de sustrato recubierto o no recubierto. El área superficial aparente no tiene en cuenta las múltiples superficies recubiertas ni consideraciones de porosidad de un material de sustrato poroso. Si el material de sustrato es poroso, el efecto de la porosidad sobre el área superficial no se considera para estos cálculos. Por ejemplo, el área superficial aparente de un injerto vascular de ePTFE tubular cilíndrico (que está hecho de un material poroso) con disulfato de dermatán unido en el punto del extremo inmovilizado sobre el material de sustrato que comprende la superficie interior del injerto tubular se calcula como se hace para cualquier geometría cilíndrica como $2\pi rL$: donde r es el radio interior del injerto; L es la longitud axial; y π es el número pi. Es importante señalar que la naturaleza porosa de ePTFE y su efecto sobre el área superficial no se tiene en cuenta aquí. Por consiguiente, los materiales de sustrato no poroso que se cortan en cuadrados para el ensayo se considera que tienen un área superficial igual a longitud multiplicada por anchura. Los resultados se expresan como cantidad de HCII unido por unidad de área superficial del material de sustrato en picomoles por centímetro cuadrado (pmol/cm^2). Todas las muestras se mantienen en condiciones de humedad a lo largo del ensayo. Es importante observar que, aunque las muestras de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) tienen cada una un área superficial total de dos centímetros cuadrados (2 cm^2) si se consideran los dos lados del material, sólo se utiliza una superficie de la muestra (es decir, 1 cm^2) para calcular la actividad de unión a HCII en pmol/cm^2 .

Algunas muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$. Otras muestras tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina superior a $12 \text{ pmol}/\text{cm}^2$. Incluso otras muestras tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina superior a $20 \text{ pmol}/\text{cm}^2$. Estos resultados demuestran la capacidad de producir una superficie con actividad de unión a HCII.

Ejemplo 34

Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), seguido por la mezcla de una composición orgánica biológicamente compatible adicional. La primera composición orgánica biológicamente compatible es heparina USP, un polisacárido, producto farmacéutico, molécula hidrófila y compuesto antitrombogénico. El segundo compuesto es polietilenglicol, un compuesto sintético e hidrófilo. Esta construcción demuestra una actividad de unión a HCII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$.

Se prepara una construcción como se describe en el Ejemplo 33. Después de la unión covalente de disulfato de dermatán, estas construcciones se exponen a las siguientes soluciones orgánicas biológicamente compatibles: heparina sódica grado USP (Celsus) y polietilenglicol (peso molecular 20.000, Sigma) a concentraciones de 0,5 g por 100 mL de agua DI ajustada a pH 9,6. Cada una de estas soluciones se denomina en la presente memoria una "solución de tratamiento". Para exponer una construcción particular que contiene disulfato de dermatán a una solución de tratamiento particular, se coloca la construcción en un vaso de precipitados de dos litros (2 L) y se añaden cien mililitros (100 mL) de la solución de tratamiento, suficientes para sumergir completamente la construcción en la solución de tratamiento. Cada construcción se expone a la solución de tratamiento durante una hora (1 h) a sesenta grados centígrados ($60 \text{ }^\circ\text{C}$). La construcción se retira de la solución y se liofiliza.

A continuación, cada construcción (incluyendo los controles) se lava con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI,

pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se hace un enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min).

5 Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina superior a 5 pmol/cm² cuando se ensayan como se describe en el Ejemplo 33. Estos resultados demuestran la capacidad de producir una superficie con actividad de unión a HCII, con la mezcla de moléculas adicionales.

Ejemplo comparativo 35

10 Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), seguido por la mezcla de una composición orgánica biológicamente compatible adicional. Este compuesto, dexametasona, es un compuesto farmacéutico sintético e hidrófilo.

15 La construcción descrita anteriormente recubierta con un material de recubrimiento se expone a una solución de dexametasona que contiene 0,5 g por 100 mL de etanol sin ajuste de pH. Esta solución se denomina en la presente memoria una "solución de tratamiento". Para exponer una construcción particular que contiene heparina a esta solución de tratamiento, se coloca la construcción en un vaso de precipitados de dos litros (2 L) y se añaden cien mililitros (100 mL) de solución de tratamiento, suficientes para sumergir completamente la construcción en la solución de tratamiento. Esta construcción se expone a la solución de tratamiento durante una hora (1 h) a sesenta grados centígrados (60 °C). La construcción se retira entonces de la solución y se liofiliza.

20 A continuación, cada construcción (incluyendo los controles) se lava con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se hace un enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min).

25 Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina superior a 5 pmol/cm² cuando se ensayan como se describe en el Ejemplo 33. Estos resultados demuestran la capacidad de producir una superficie con actividad de unión a HCII, con una mezcla de moléculas adicionales.

Ejemplo 36

Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), seguido por la mezcla de composiciones orgánicas biológicamente compatibles. La construcción presenta una unión significativa a HCII después de exposición a la esterilización con óxido de etileno (EtO).

30 Las muestras con disulfato de dermatán biológicamente activo se preparan como se describe en el Ejemplo 33. Las composiciones orgánicas biológicamente compatibles de polietilenglicol, heparina USP y dexametasona se mezclan con muestras separadas como se describe en los Ejemplos 34 y 35.

35 En la preparación para la esterilización con EtO, cada construcción liofilizada se coloca y se sella en una bolsa autosellable Tower DUALPEEL® (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL). Se lleva a cabo la esterilización con óxido de etileno en condiciones de, acondicionamiento de la carga durante una hora (1 h), un tiempo de exposición al gas EtO de una hora (1 h), una temperatura de consigna de cincuenta y cinco grados centígrados (55 °C), y un tiempo de aireación de doce horas (12 h).

40 Después de la esterilización con EtO, cada construcción (incluyendo los controles) se retira de su bolsa y se lava con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente se hace un enjuague con agua DI durante quince minutos (15 min).

45 Las muestras preparadas como se describe en este ejemplo tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina superior a 5 pmol/cm² cuando se ensayan como se describe en el Ejemplo 33. Estos resultados demuestran la capacidad de producir una superficie con actividad de unión a HCII, con una mezcla de moléculas adicionales, después de la esterilización con EtO.

Ejemplo 37

Este ejemplo describe la construcción de una realización de la presente invención en la cual la unión a HCII de disulfato de dermatán (17) sobre un producto sanitario es superior a 5 pmol/cm² después de la compactación y la expansión mecánicas.

50 El producto sanitario implantable utilizado en este ejemplo está en la forma de un tubo reforzado de alambre de nitinol hecho de un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) poroso, obtenido de W.L. Gore & Associates, Inc., Flagstaff, AZ bajo el nombre comercial de endoprótesis VIABAHN®. El dispositivo tubular tiene quince centímetros (15 cm) de largo y seis milímetros (6 mm) de diámetro.

La endoprótesis VIABAHN® está constreñida dentro de un catéter de administración y requiere la retirada del catéter antes de inmovilizar heparina sobre la misma. Cada dispositivo constreñido en el catéter se retira para el procesado tirando de una cuerda de liberación unida a una vaina de constricción y liberando la vaina de alrededor del dispositivo. Una vez libre, cada dispositivo se expande y se utiliza como un material de sustrato separado. Cada material de sustrato (dispositivo de endoprótesis) se sumerge en una solución de PEI (al 5 % en agua DI) e IPA (grado USP) en una relación en tanto por ciento en volumen de 30:70, respectivamente, durante aproximadamente doce horas (12 h) para colocar un material de recubrimiento polimérico (18) sobre el material de sustrato (12). El material de recubrimiento polimérico (18) tiene una multiplicidad de grupos químicos reactivos (16) a los cuales eventualmente se une en el punto del extremo una pluralidad de moléculas de disulfato de dermatán (17) modificado con aldehído.

Al menos una capa adicional de material de recubrimiento (18a, 18b) se coloca sobre la primera capa de PEI (18). Esto se realiza colocando cada dispositivo endoprotésico dentro de un tubo separado de silicona y conectando el tubo a una bomba peristáltica y depósito de solución. Esto hace posible que una solución adicional que contiene un material de recubrimiento sea pasada repetidamente a través del centro del producto sanitario tubular para recubrir principalmente las superficies interiores del dispositivo.

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

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

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

Se une o se conjuga disulfato de dermatán modificado con aldehído a la capa o capas de PEI colocando la construcción en una solución salina de cloruro de sodio que contiene disulfato de dermatán (1,5 g de disulfato de dermatán, 29,3 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 3,9) durante ciento veinte minutos (120 min) a sesenta grados centígrados (60 °C). Se añade un volumen de 2,86 mL de una solución acuosa al 2,5 % (p/v) de NaCNBH₃ al dicho un litro (1 L) de la solución de disulfato de dermatán antes de añadir las muestras. Se enjuagan entonces las muestras con agua DI durante quince minutos (15 min), con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH y 0,7 g de NaCl disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min), y finalmente con agua DI durante quince minutos (15 min) seguido por la liofilización de la construcción completa para producir disulfato de dermatán seco unido al material de ePTFE. La presencia y uniformidad del disulfato de dermatán se determina tiñendo las muestras de la construcción en ambos lados con azul de toluidina. La tinción produce una superficie de color púrpura uniforme que indica que el disulfato de dermatán está presente y uniformemente unido al material de ePTFE.

Para comprimir y compactar los dispositivos endoluminales en un sistema de administración, se tira de cada endoprótesis a través de un embudo estrecho con un diámetro fijo. Cada endoprótesis tiene seis (6) puntos de sutura (Gore-Tex® CV-O, 0N05) cosidos a través de un extremo para arrastrar los dispositivos a través del embudo. Se tira de cada dispositivo a través de la abertura de la punta de una pipeta de veinticinco mililitros (25 mL) (Falcon® producto n° 357525) con un diámetro de aproximadamente tres mililitros (3 mm) y dentro de un tubo de vidrio con un diámetro de aproximadamente 3,1 mm para mantenerlo en estado compactado.

Después de la compactación, cada endoprótesis se despliega en una solución acuosa salina al 0,9 % a treinta y siete grados centígrados (37 °C). Se prepara cada endoprótesis para el ensayo lavando con agua DI durante quince minutos (15 min), seguido por un enjuague con solución tampón de borato (10,6 g de ácido bórico, 2,7 g de NaOH, 0,7 g de NaCl, disueltos en 1 L de agua DI, pH 9,0) durante veinte minutos (20 min) y un enjuague final de quince minutos (15 min) con agua DI.

Se cortan muestras de material que contiene disulfato de dermatán de cada endoprótesis (aproximadamente 0,5 cm de largo) y se mide la heparina unida en cuanto a la actividad biológica utilizando el ensayo de unión a cofactor II de

heparina descrito anteriormente (Ejemplo 33). Las muestras se mantienen en condiciones de humedad durante el procedimiento de ensayo. Los resultados se expresan como la unión a cofactor II de heparina por unidad de área superficial de sustrato (pmol/cm^2 de material de sustrato).

- 5 Las muestras en este ejemplo tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$. Estos resultados demuestran la capacidad de producir una superficie con actividad de unión a HCII, después de compactación y expansión mecánicas.

Ejemplo 38

- 10 Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán (17) biológicamente activo a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), seguido por la mezcla de composiciones orgánicas biológicamente compatibles. La construcción presenta una unión significativa a HCII después de exposición a la compactación y la expansión mecánicas.

Las muestras con disulfato de dermatán biológicamente activo se preparan como se describe en el Ejemplo 37. Las composiciones orgánicas biológicamente compatibles de polietilenglicol, heparina USP y dexametasona se mezclan con muestras separadas como se describe en los Ejemplos 34 y 35.

- 15 Las construcciones se compactan posteriormente mecánicamente, se expanden, se lavan, se muestrean y se ensayan como se describe en el Ejemplo 37. Las construcciones tratadas de este modo presentan una actividad de unión al HCII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ cuando se ensayan como se describe en el Ejemplo 33.

Ejemplo 39

- 20 Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) y heparina (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), con una unión al HCII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ y una unión a la antitrombina III (ATIII) superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$.

De acuerdo con la patente de Estados Unidos N° 6.653.457, se fabrica una composición de heparina modificada con aldehído según la patente de Estados Unidos N° 4.613.665.

- 25 Se prepara una construcción de ePTFE como se describe en el Ejemplo 33, con la excepción de que el procedimiento se refiere a la unión de disulfato de dermatán modificado con aldehído. En esta etapa de tratamiento, en lugar de solamente 1,5 g de sulfato de dermatán, se añaden a la solución 1,5 g de heparina modificada con aldehído y 1,5 g de sulfato de dermatán modificado con aldehído.

- 30 La actividad de unión a HCII se mide como se describe en el Ejemplo 33. Se ensayan también las muestras en cuanto a la actividad de ATII midiendo la capacidad de la heparina unida en el punto del extremo para unirse a la ATIII. El ensayo está descrito por Larsen M. L, et al. en "Assay of plasma heparin using thrombin and the chromogenic substrate H-D-Phe-Pip-Arg-pNA" (S-2238) (Thromb. Res. 1978; 13: 285-288) y Pasche B., et al. en "A binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions" (Artif. Organs 1991; 15: 281-491). Los resultados se expresan como la cantidad de ATIII unida por unidad de área superficial del material de sustrato en picomoles por centímetro cuadrado (pmol/cm^2). Todas las muestras se mantienen en condiciones de humedad a lo largo del ensayo. Es importante observar que, aunque las muestras de aproximadamente un centímetro cuadrado (1 cm^2) tienen cada una un área superficial total de dos centímetros cuadrados (2 cm^2) si se consideran los dos lados del material, sólo se utiliza una superficie de la muestra (es decir, 1 cm^2) para calcular la actividad de unión de heparina-ATIII en pmol/cm^2 .

- 40 Las construcciones preparadas y ensayadas como se describe en este ejemplo presentan tanto una actividad de unión a HCII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ como de unión a ATIII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$.

Ejemplo 40

- 45 Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) y heparina (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), con la inclusión de la mezcla de una composición orgánica biológicamente compatible y que da como resultado una unión al HCII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ y una unión a la ATIII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$, después de la esterilización con EtO.

Las muestras se preparan como se describe en el Ejemplo 39. Las composiciones orgánicas biológicamente compatibles de polietilenglicol, heparina USP y dexametasona se mezclan con muestras separadas como se describe en los Ejemplos 34 y 35. Después estas muestras se esterilizan como se describe en el Ejemplo 36.

- 50 Las construcciones preparadas y ensayadas como se describe en este ejemplo presentan tanto una actividad de unión a HCII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$ como de unión a ATIII superior a $5 \text{ pmol}/\text{cm}^2$.

Ejemplo 41

5 Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) y heparina (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), con la inclusión de una mezcla de una composición orgánica biológicamente compatible (11) y que da como resultado una unión al HCII superior a 5 pmol/cm^2 y una unión a la ATIII superior a 5 pmol/cm^2 , después de la compactación y la expansión mecánicas.

10 Se preparan endoprótesis VIABAHN® como se describe en el Ejemplo 37, con la excepción de que el procedimiento se refiere a la unión de disulfato de dermatán modificado con aldehído. En esta etapa de tratamiento, en lugar de solamente 1,5 g de disulfato de dermatán, se añaden a la solución 1,5 g de heparina modificada con aldehído y 1,5 g de disulfato de dermatán modificado con aldehído. A continuación, las composiciones orgánicas biológicamente compatibles de polietilenglicol, heparina USP, y dexametasona se mezclan con muestras separadas como se describe en los Ejemplos 34 y 35. Antes del ensayo, las muestras se lavan entonces como se describe en el Ejemplo 34.

15 Las construcciones preparadas y ensayadas como se describe en este ejemplo presentan tanto una actividad de unión a HCII superior a 5 pmol/cm^2 como de unión a ATIII superior a 5 pmol/cm^2 después de la compactación y la expansión mecánicas.

Ejemplo 42

20 Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), seguido por la esterilización. La construcción presenta una unión significativa al HCII después de exposición a la esterilización con óxido de etileno (EtO).

Las muestras con disulfato de dermatán biológicamente activo se preparan como se describe en el Ejemplo 33 y se esterilizan como se describe en el Ejemplo 36. Las construcciones preparadas y ensayadas como se describe en este ejemplo presentan una actividad de unión a HCII superior a 5 pmol/cm^2 .

Ejemplo 43

Este ejemplo describe la unión covalente de disulfato de dermatán biológicamente activo (17) y heparina (17) a un material de recubrimiento o capa de recubrimiento, colocado sobre un material de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), con unión a HCII superior a 5 pmol/cm^2 y unión a la antitrombina III (ATIII) superior a 5 pmol/cm^2 después de la esterilización con EtO.

30 Las muestras se preparan como se describe en el Ejemplo 39 y se someten a esterilización como se describe en el Ejemplo 36, y se ensayan como se describe en el Ejemplo 39. Las muestras preparadas y ensayadas como se describe en este ejemplo presentan una actividad de unión a HCII superior a 5 pmol/cm^2 y de unión a ATIII superior a 5 pmol/cm^2 .

Ejemplo 44

35 Este ejemplo describe la construcción de una realización de la presente invención en la cual la unión a HCII de disulfato de dermatán (17) sobre un sustrato de un producto sanitario es superior a 5 pmol/cm^2 después de la esterilización.

40 Las muestras con disulfato de dermatán biológicamente activo se preparan como se describe en el Ejemplo 37, se esterilizan como se describe en el Ejemplo 36, y se ensayan como se describe en el Ejemplo 33. Las muestras preparadas y ensayadas como se describe en este ejemplo presentan una actividad de unión a HCII superior a 5 pmol/cm^2 .

REIVINDICACIONES

1. Un producto sanitario que comprende:

un material de sustrato;

un material de recubrimiento polimérico unido al menos a una porción de una superficie de dicho material de sustrato, una pluralidad de entidades biológicamente activas que tienen actividad de unión al cofactor II de heparina unidas covalentemente al menos a una porción de dicho material de recubrimiento polimérico; comprendiendo dicha pluralidad de entidades biológicamente activas disulfato de dermatán; y

una composición orgánica biológicamente compatible que comprende un glucosaminoglucano, dextrano, sulfato de dextrano, polietilenglicol o glicerol, en donde la composición orgánica biológicamente compatible está combinada de forma no covalente con dichas entidades biológicamente activas y dicho material de recubrimiento polimérico;

en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2).

2. Un producto sanitario según la reivindicación 1, en donde dicha composición biológicamente compatible tiene actividad de unión a la antitrombina III.

3. Un producto sanitario de la reivindicación 1, que comprende además una segunda pluralidad de entidades biológicamente activas que tienen actividad de unión a la antitrombina III unidas covalentemente al menos a una porción de dicho material de recubrimiento polimérico,

en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 5 picomoles de antitrombina III por centímetro cuadrado.

4. El producto sanitario de la reivindicación 1, en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) después de la esterilización, o en donde dichas entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) después de la compactación y expansión.

5. El producto sanitario de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas comprende disulfato de dermatán unido en el punto del extremo.

6. El producto sanitario de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tiene una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 12 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2), o en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tiene una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 20 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2).

7. El producto sanitario de la reivindicación 2, en donde al menos una porción de dicha pluralidad de entidades biológicamente activas se libera de dicho producto sanitario en una solución tampón de fosfato 0,15 M que tiene una temperatura de aproximadamente treinta y siete grados centígrados y un pH sustancialmente neutro.

8. El producto sanitario de la reivindicación 2, en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato después de la esterilización de dicho material de sustrato, o en donde dicha pluralidad de entidades biológicamente activas tienen una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato

9. El producto sanitario de la reivindicación 3, en donde dicha primera pluralidad de entidades biológicamente activas comprende disulfato de dermatán, o en donde dicha primera pluralidad de entidades biológicamente activas comprende disulfato de dermatán unido en el punto del extremo.

10. El producto sanitario de la reivindicación 3, en donde al menos una porción de dicha composición biológicamente compatible se libera de dicho producto sanitario en una solución tampón de fosfato 0,15 M que tiene una temperatura de aproximadamente treinta y siete grados centígrados y un pH sustancialmente neutro.

11. El producto sanitario de la reivindicación 3, en donde dicha primera pluralidad de entidades biológicamente activas tiene una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato después de la esterilización de dicho material de sustrato, o en donde dicha primera pluralidad de entidades biológicamente activas tiene una actividad de unión al cofactor II de heparina de al menos 5 picomoles de cofactor II de heparina por centímetro cuadrado (pmol/cm^2) de material de sustrato después de la compactación y expansión de dicho material de sustrato

12. El producto sanitario de la reivindicación 3, en donde dicha composición biológicamente compatible comprende la co-inmovilización de heparina y disulfato de dermatán.

13. El producto sanitario según la reivindicación 3, en donde el glucosaminoglucano es heparina.

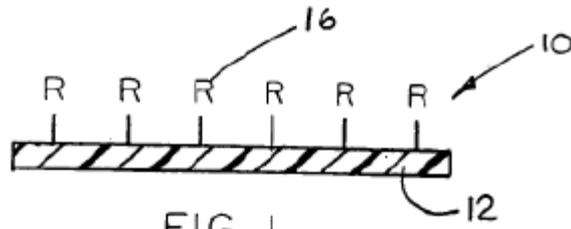


FIG. 1

TÉCNICA ANTERIOR

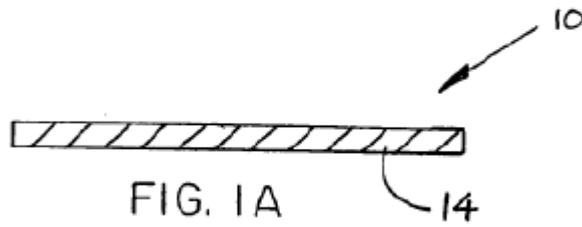


FIG. 1A

TÉCNICA ANTERIOR

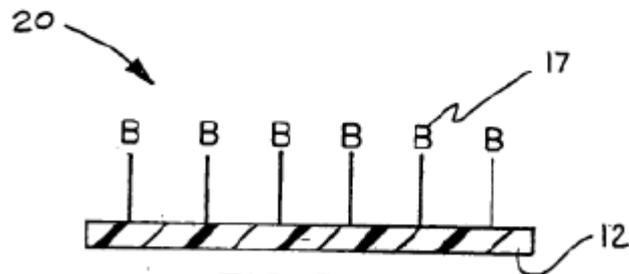
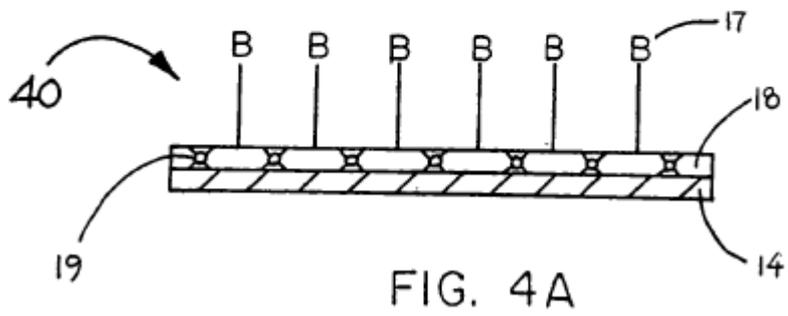
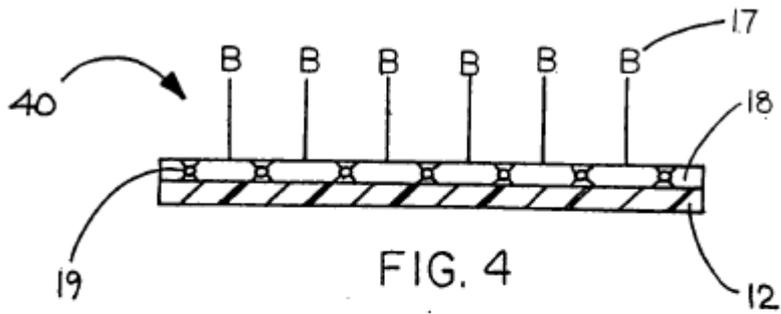
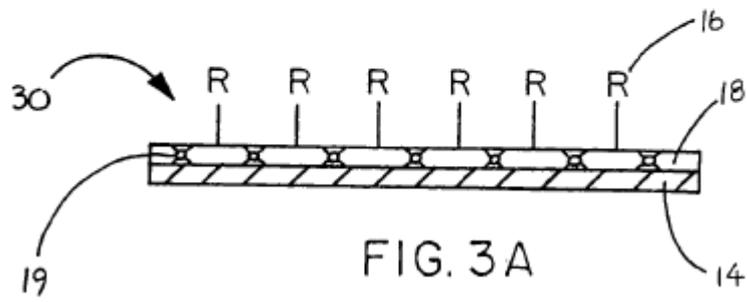
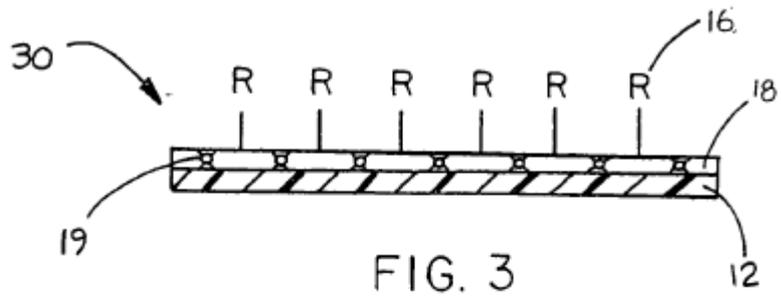


FIG. 2

TÉCNICA ANTERIOR



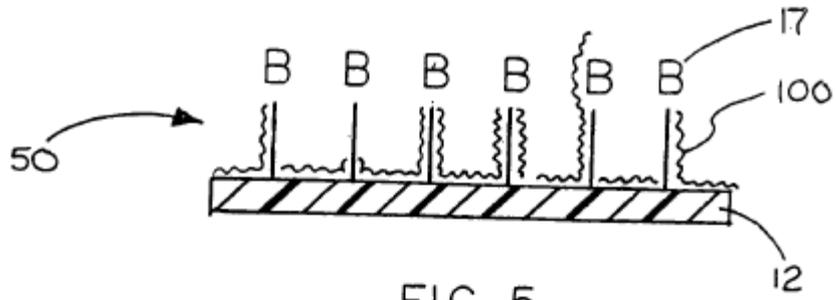


FIG. 5

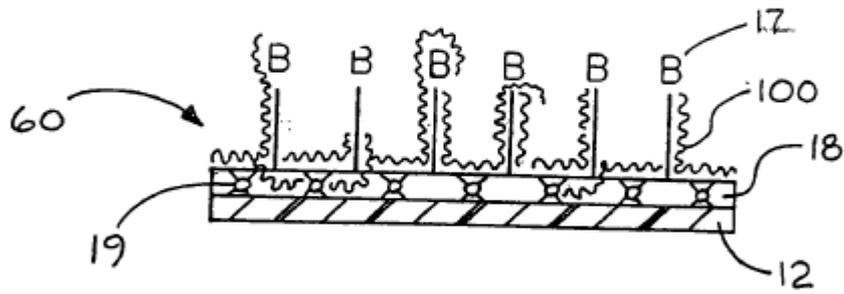


FIG. 6

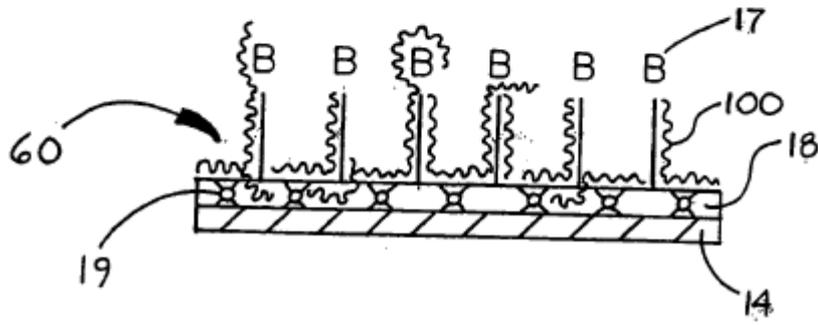


FIG. 6A

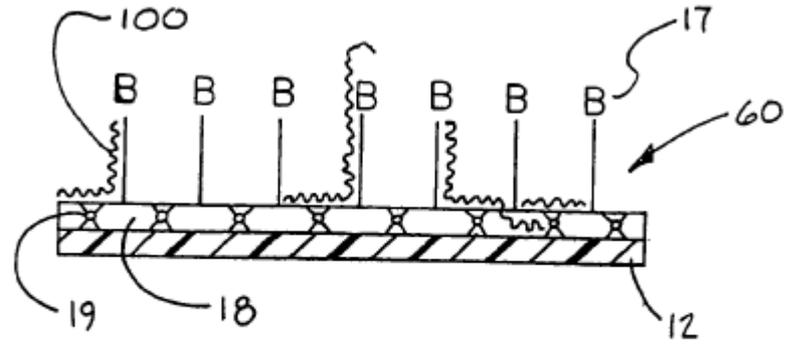


FIG. 6 B

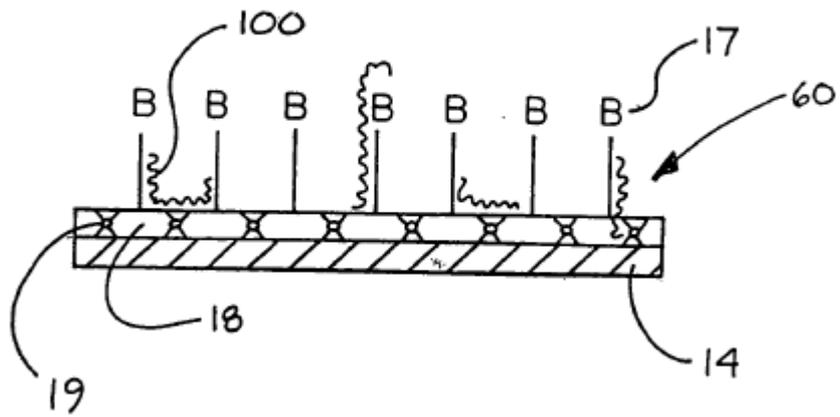
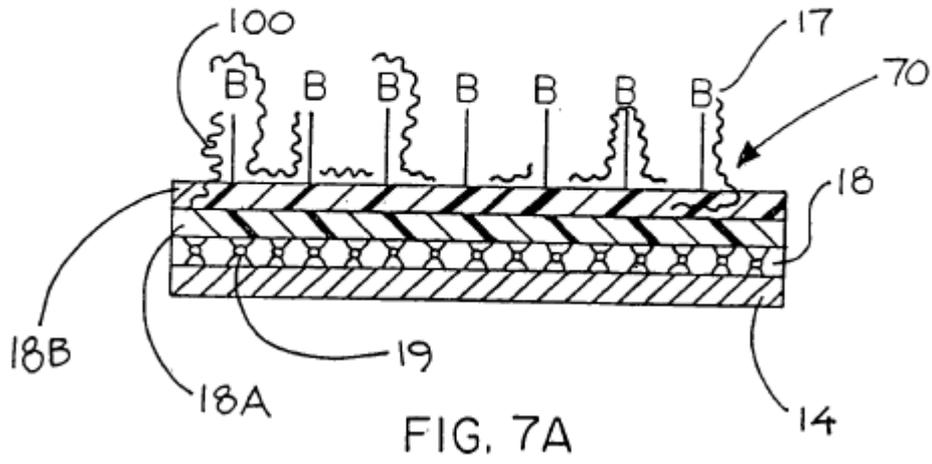
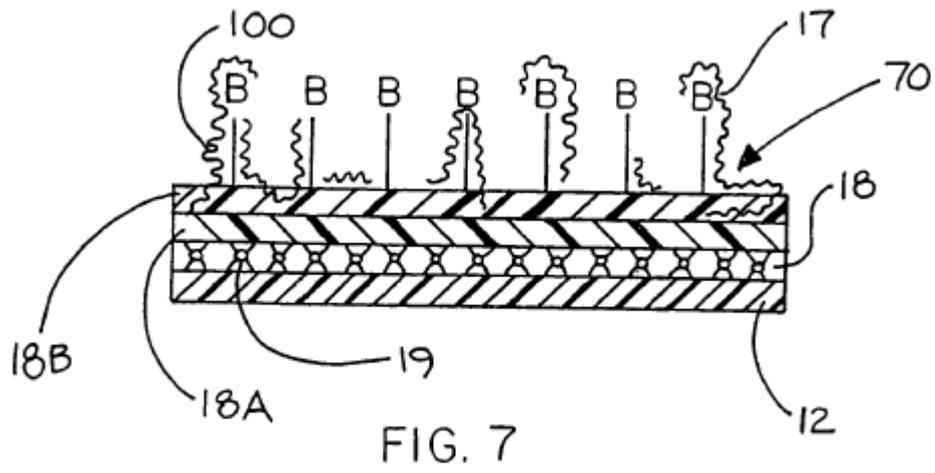
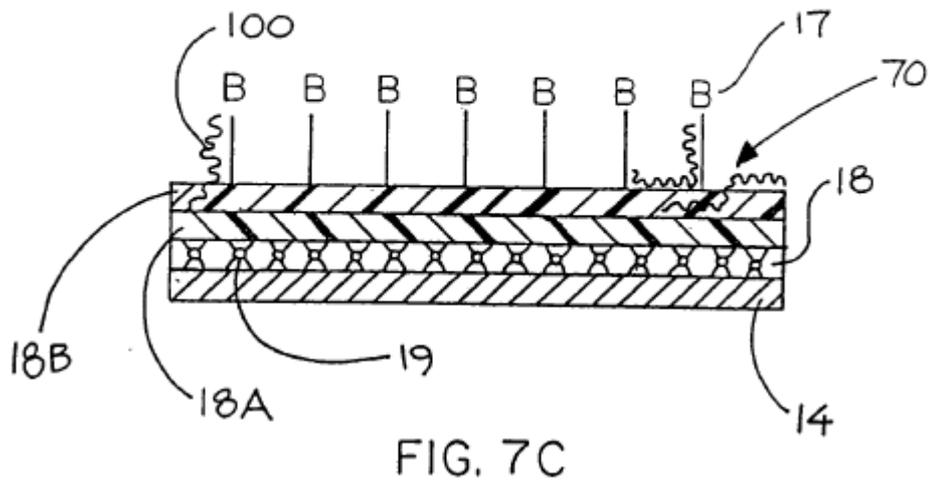
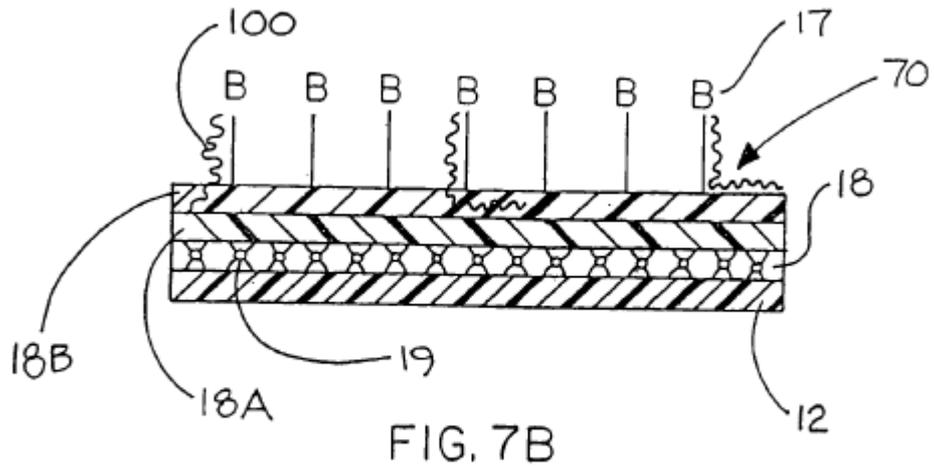


FIG. 6 C





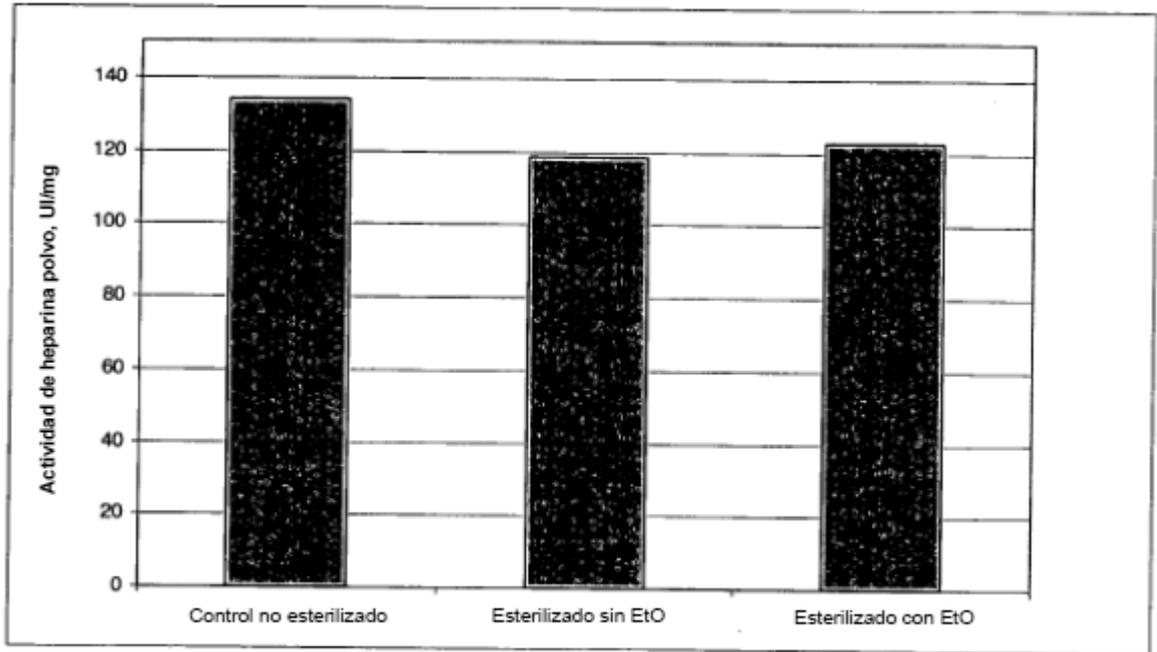


Figura 8

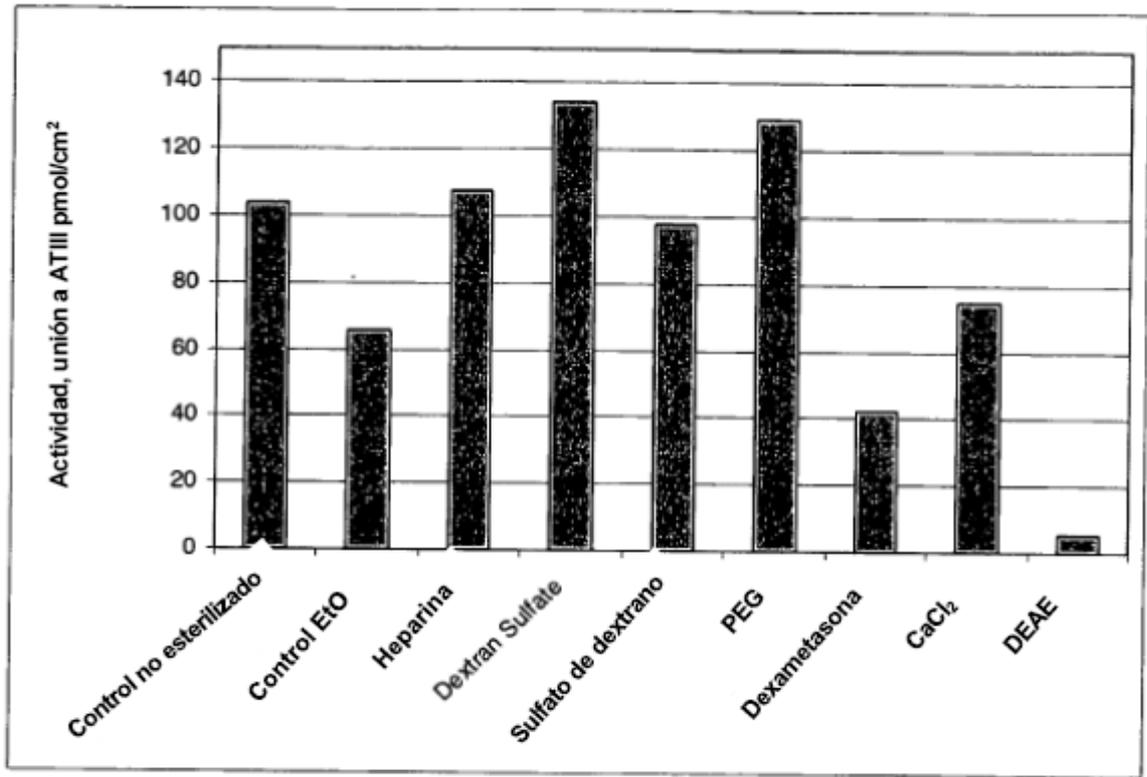


Figura 9

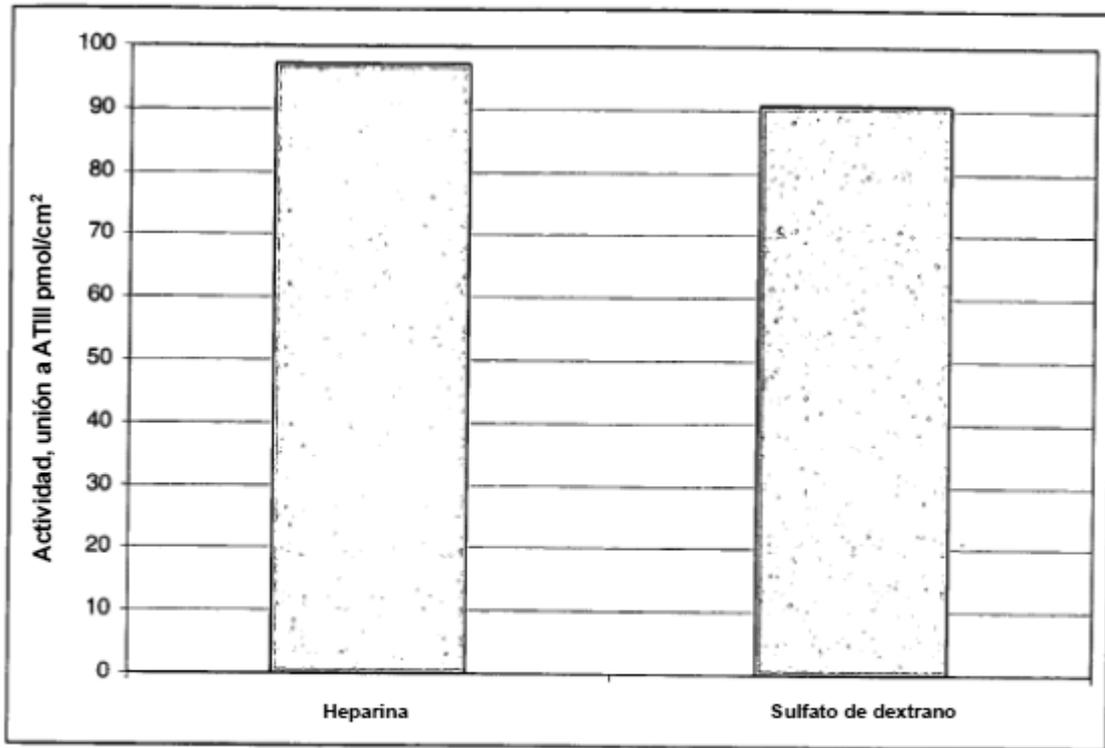


Figura 10

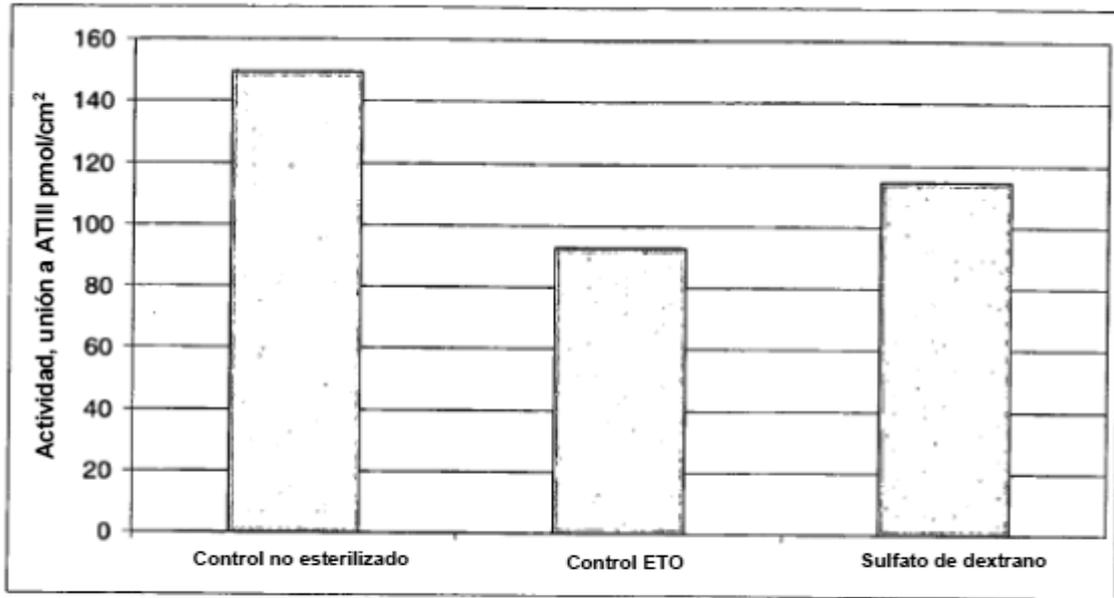


Figura 11

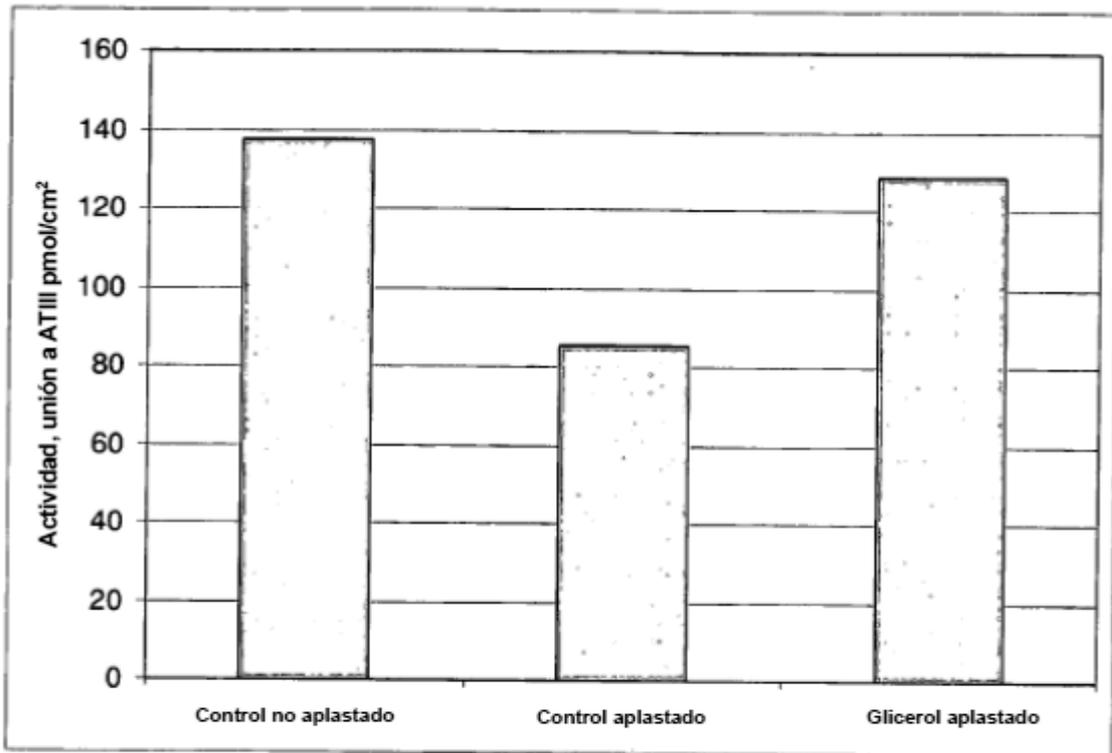


Figura 12

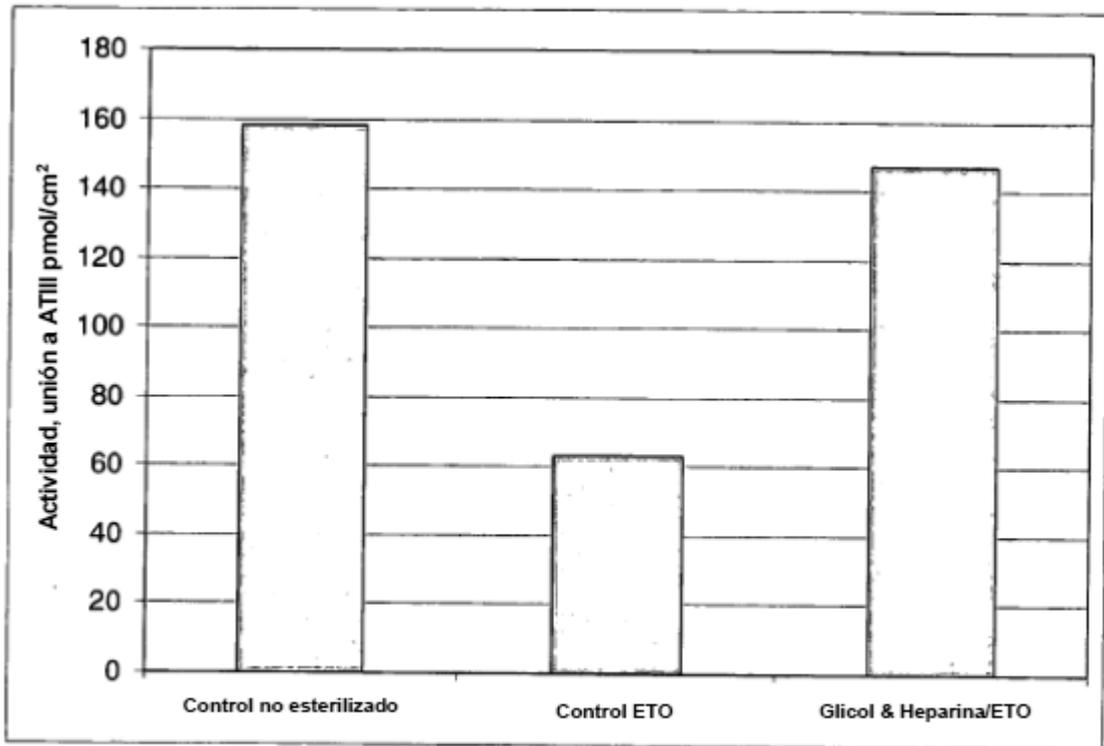


Figura 13

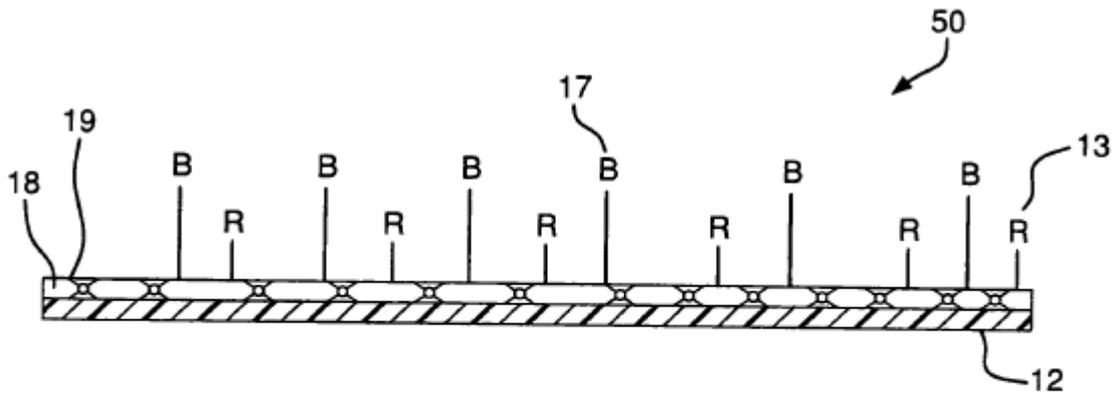


FIG. 14

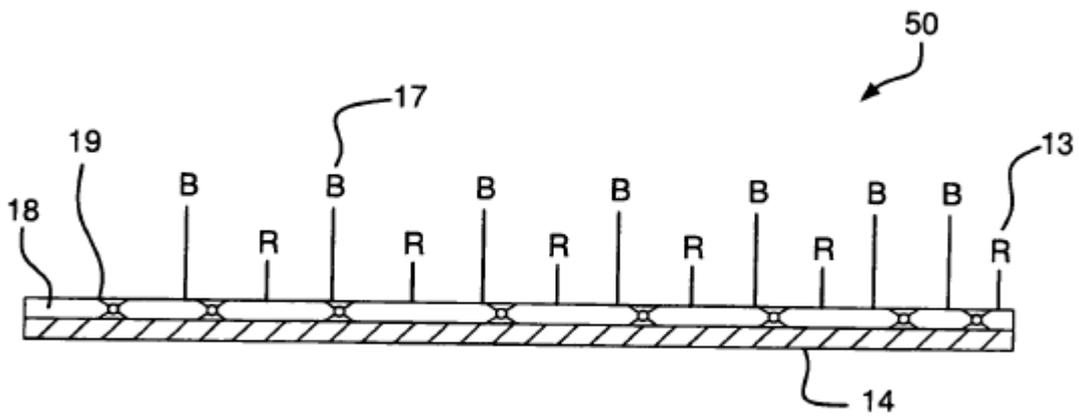


FIG. 15

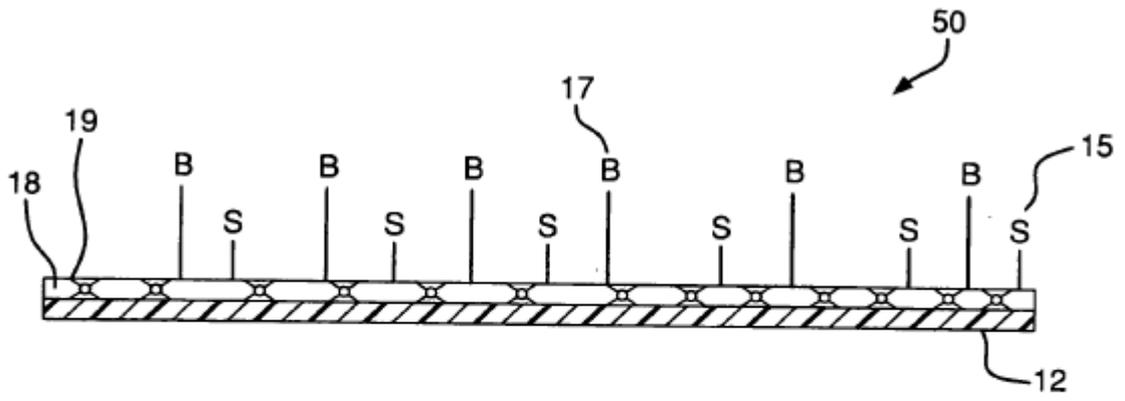


FIG. 16

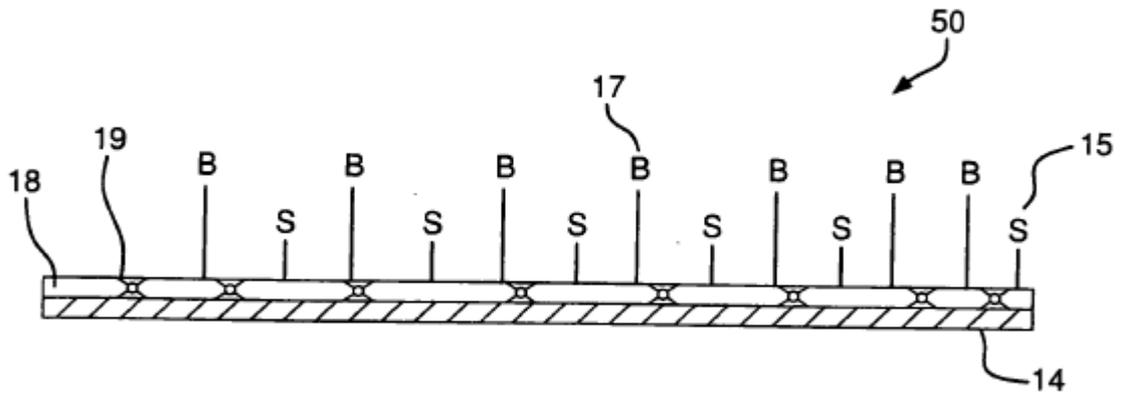


FIG. 17

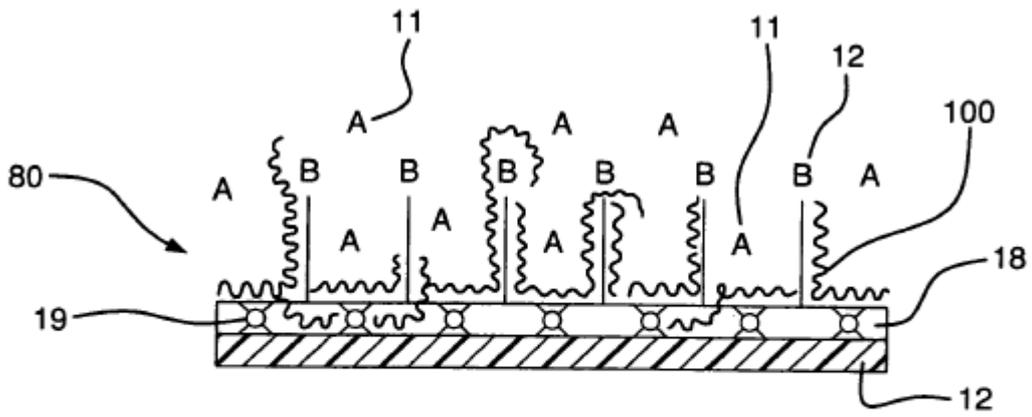


FIG. 20

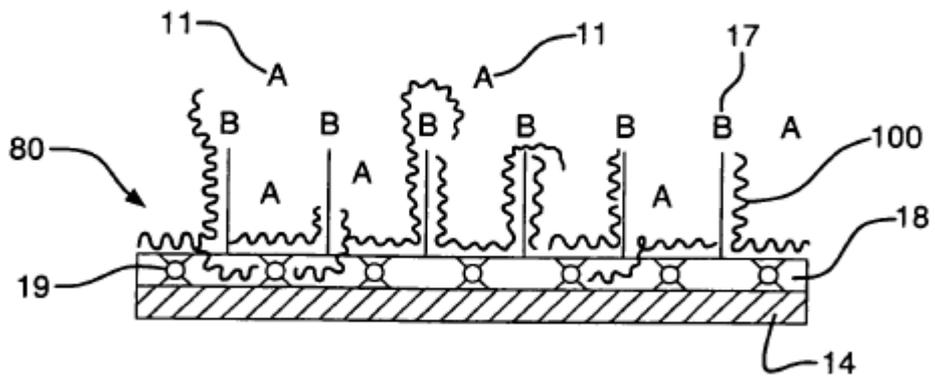


FIG. 21