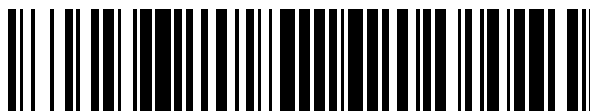


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 482**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 31/10 (2006.01)

A61L 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012** **PCT/EP2012/054179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2012** **WO12123384**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012** **E 12708138 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** **EP 2683420**

54 Título: **Mejoras para las entidades biológicas inmovilizadas**

30 Prioridad:

11.03.2011 US 201161451732 P

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

20.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LEONTEIN, KARIN;
ANTONI, PER;
NYSTRÖM, DANIEL;
BEGOVAC, PAUL y
PIETRZAK, KRZYSZTOF

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 682 482 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

Mejoras para las entidades biológicas inmovilizadas

Esta invención se refiere a entidades biológicas inmovilizadas, a dispositivos que tienen revestimientos de la superficie que comprenden tales entidades, y procedimientos e intermedios para su producción. En particular, la invención se refiere a restos de heparina inmovilizados y a dispositivos, por ejemplo, productos sanitarios, dispositivos analíticos y de separación, que tienen revestimientos de la superficie que comprenden heparina inmovilizada.

Antecedentes de la invención

Cuando se coloca un producto sanitario en el organismo, o en contacto con líquidos corporales, se ponen en marcha una serie de reacciones diferentes, en donde algunas de ellas dan lugar a la coagulación de la sangre en contacto con la superficie del dispositivo. Para contrarrestar este efecto adverso grave, la heparina, un compuesto anticoagulante bien conocido, se ha administrado desde hace mucho tiempo de forma sistémica a los pacientes antes de colocarles el producto sanitario en el organismo, o cuando éste está en contacto con los líquidos corporales, para proporcionar un efecto antitrombótico.

La trombina es uno de los diferentes factores de coagulación, y todos ellos trabajan juntos para dar lugar a la formación de trombos en una superficie en contacto con la sangre. La antitrombina (también conocida como antitrombina III) («AT» o «ATIII») es el inhibidor de coagulación más destacado. Neutraliza la acción de la trombina y de otros factores de coagulación, y de esta forma restringe o limita la coagulación de la sangre. La heparina mejora considerablemente la velocidad a la cual la antitrombina inhibe los factores de coagulación.

Sin embargo, el tratamiento sistémico con dosis altas de heparina a menudo está relacionado con efectos secundarios graves, de los cuales la hemorragia es el que predomina. Otra complicación rara pero grave del tratamiento con heparina es el desarrollo de una respuesta inmunitaria denominada trombocitopenia inducida por heparina (TIH) que podría acabar en trombosis (tanto venosa como arterial). El tratamiento con heparina sistémica a dosis altas, p. ej., durante la cirugía, también necesita la vigilancia frecuente del tiempo de coagulación activado (utilizado para vigilar y guiar el tratamiento con heparina) y los correspondientes ajustes de la dosis a medida que sean necesarios.

Por lo tanto, se han perseguido soluciones en las que la necesidad de una heparinización sistémica del paciente sería innecesaria o se podría limitar. Se pensó que este se podría conseguir a través de una modificación de la superficie de los productos sanitarios mediante el uso de las propiedades anticoagulantes de la heparina. Así pues, se han desarrollado una serie de tecnologías más o menos satisfactorias en las que se une una capa de heparina a la superficie del producto sanitario, con lo que se pretende que la superficie se vuelva no trombogénica. Para los dispositivos en los que se necesita que la bioactividad se mantenga a largo plazo, lo deseable es que la capa de heparina sea resistente a la lixiviación y a la degradación.

La heparina es un polisacárido que lleva grupos sulfato y carboxilato cargados negativamente en las unidades del sacárido. Se ha intentado la fijación iónica de la heparina a las superficies policationicas, pero estas modificaciones de la superficie tienden a sufrir por la falta de estabilidad con el tiempo, lo que da lugar a la pérdida de la función no trombogénica, ya que la heparina se lixivia desde la superficie.

Después de esto, se han preparado diferentes modificaciones de las superficies, en donde la heparina se ha fijado covalentemente a los grupos de la superficie.

Uno de los procedimientos más satisfactorios para generar un producto sanitario no trombogénico ha sido la fijación covalente de un fragmento de heparina a una superficie modificada del dispositivo. El método general y las mejoras del mismo se describen en las patentes europeas: EP-B-0086186, EP-B-0086187, EP-B-0495820 y en la patente de los Estados Unidos US 6.461.665.

Estas patentes describen la preparación de sustratos con la superficie modificada mediante, primero, una escisión selectiva de la cadena del polisacárido heparina, p. ej., mediante la degradación con ácido nitroso, lo que conduce a la formación de grupos aldehído terminales. Segundo, la introducción de una o varias capas modificadoras de la superficie que llevan grupos de amina primaria en la superficie del producto sanitario, y después hacer reaccionar los grupos aldehído de la cadena de polisacárido con los grupos amino de las capas modificadoras de la superficie, seguido de una reducción de las bases de Schiff intermedias para formar enlaces de amina secundaria estables.

Se conocen otros métodos para modificar superficies. Por ejemplo, la patente de los EE. UU. US 2005/0059068 se refiere a un sustrato para ser usado en microensayos. Un dendrímero de poliamina activada se fija covalentemente a la superficie del sustrato a través de un resto que contiene silano. El dendrímero tiene puntos de ramificación que son aminas terciarias y restos terminales que son grupos NH_2 , OH , COOH o SH . Las moléculas que contienen los grupos funcionales OH o NH_2 pueden estar fijados al dendrímero a través de los restos terminales del dendrímero. Ya que el sustrato es para ser usado en microensayos, suele ser un portaobjetos, una perla, una placa con pocillos, una membrana, etc., y el resto que contiene el grupo OH o NH_2 es un ácido nucleico, una proteína o un péptido.

La solicitud de patente internacional WO 03/057270 describe un producto sanitario, por ejemplo, lentes de contacto, con un revestimiento lubricante cuya superficie tiene es muy hidrófila. Se ofrecen numerosos ejemplos de materiales de revestimiento, entre ellos los glucosaminoglucanos (p. ej., heparina o sulfato de condroitina) y dendrímeros de PAMAM. Se dice que los dendrímeros de PAMAM están entre los revestimientos preferidos. El documento ejemplifica unas lentes de contacto que tienen varias capas de dendrímero de PAMAM y un copolímero de poliacrilamida-co-ácido poliacrílico (PAAm-co-PAA). El revestimiento se forma al sumergir consecutivamente las lentes de contacto en soluciones de los dos materiales de revestimiento, en donde la capa externa es PAAm-co-PAA.

La patente de los EE. UU. US 2003/0135195 da a conocer un producto sanitario, tal como un catéter, con un revestimiento hidrófilo muy lubricante formado por una mezcla de polímero de poliuretano alifático coloidal, una dilución acuosa de poli(1-vinilpirrolidona-co-2-dimetilaminoetilmetacrilato)-PVP y dendrímeros. El documento da a conocer que el revestimiento se podría aplicar al dispositivo al sumergir el dispositivo en una dispersión coloidal del polímero de poliuretano alifático en una solución de poli(1-vinilpirrolidona-co-2-dimetilaminometacrilato)-PVP y un agente activo (p. ej., heparina) en una mezcla de dendrímero, agua, *N*-metil-2-pirrolidona y trietilamina. El documento da a conocer que la heparina podría estar contenida en los espacios vacíos dentro de los dendrímeros. El documento también da a conocer que la heparina cargada se eluirá de la matriz del polímero hidrófilo a una velocidad predeterminada.

La patente de los EE. UU. US 2009/0274737 da a conocer implantes, tales como muelles endovasculares, que tienen una superficie hidrófila con un ángulo de humectancia de $\leq 80^\circ$. Podría haber uno, dos o más ingredientes anticoagulantes fijados permanentemente a la superficie, y los ejemplos de anticoagulantes incluyen la heparina y determinados dendrímeros, en particular los dendrímeros sulfatados. La superficie podría estar funcionalizar para fijar el anticoagulante, y los ejemplos de funcionalización son la silanización y la reacción con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI).

La patente de los EE. UU. US 4.944.767 se refiere a un material polimérico que es capaz de adsorber una gran cantidad de heparina. El material es un copolímero en bloque en el cual las cadenas de poliuretano están interconectadas con cadenas de poliamidoamina.

La solicitud de patente internacional WO 01/41827 describe un material que comprende una combinación de un material biomimético y una sustancia adaptada para permitir que el material biomimético adopte la orientación estructural apropiada para conseguir la eficacia máxima como biomimético.

Nuestra solicitud anterior de patente internacional WO 2010/029189 hace referencia a un producto sanitario que tiene un revestimiento con una molécula anticoagulante, tal como heparina, unida covalentemente al revestimiento a través de un enlace 1,2,3-triazol. El documento describe la funcionalización de una poliamina con azida o alquino; la preparación de la heparina funcionalizada con alquino o azida (tanto la heparina nativa como la degradada con ácido nitroso); y la reacción para conectar la heparina modificada al polímero modificado a través de un enlace 1,2,3-triazol.

El producto descrito en la patente internacional WO 2010/029189 tiene muchas ventajas, pero nosotros hemos perseguido el desarrollo de un material mejorado en el que aumente la biodisponibilidad de la heparina o de otra molécula anticoagulante fijada, que podría tener una mayor estabilidad al envejecer y que se pueda fabricar mediante un procedimiento que sea robusto y produzca un producto de consistencia elevada.

Las heparinas tienen la capacidad de fijarse a una amplia variedad de biomoléculas, entre ellas enzimas, inhibidores de serina proteasas (tales como antitrombina), factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular, enzimas de modificación del ADN y receptores hormonales. Si se utiliza en la cromatografía, la heparina no es sólo un ligando de afinidad, sino también un intercambiador de iones con una densidad de carga elevada. Así pues, las biomoléculas pueden ser adsorbidas de forma específica y reversible por las heparinas inmovilizadas en un soporte insoluble. Por lo tanto, las heparinas inmovilizadas tienen numerosas aplicaciones útiles que no son médicas, en concreto para el análisis y la separación.

Compendio de la invención

De acuerdo con la invención, los autores damos a conocer, entre otras cosas, una molécula de polímero hiperramificado y catiónico caracterizada por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 10.000 a 300.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1, y (iv) grupos funcionales terminales, gracias a lo cual uno o varios de dichos grupos funcionales terminales tienen un resto de heparina unido covalentemente por un único punto a ellos, en donde dicho resto de heparina está unido covalentemente por un único punto a la molécula del polímero hiperramificado a través del extremo reductor del resto de heparina, y en donde el polímero hiperramificado no es un dendrímero. También se da a conocer un dispositivo que tiene una superficie que comprende un revestimiento de capas, en donde la capa externa del revestimiento comprende muchas de tales moléculas del polímero hiperramificado catiónico.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 hay una representación esquemática bidimensional de diferentes tipos de polímeros hiperramificados, en los que A representa un polímero con puntos de ramificación (teóricamente) en cada unidad monomérica; B representa un polímero ramificado con un esqueleto lineal y enclavamientos ramificados, llamados dendrones, unidos a él; C representa un polímero con unidades de ramificación incorporadas en segmentos lineales; y D representa un dendrímero.

En la figura 2 se ilustra bidimensionalmente un dendrímero de PAMAM que tiene 3 generaciones (en tres dimensiones, la estructura sería aproximadamente esférica).

En la figura 3 hay una ilustración esquemática bidimensional de un dendrímero de segunda generación en el que el centro tiene tres grupos funcionales reactivos, todos los cuales están sustituidos; la primera capa tiene seis grupos funcionales reactivos, todos ellos con sustituciones; y la segunda capa tiene doce grupos funcionales reactivos. Tal dendrímero adoptará una forma sustancialmente esférica en tres dimensiones.

En la figura 4 se ilustra cómo un primer grupo funcional sobre un resto de heparina (u otra entidad anticoagulante) se podría hacer reaccionar con un segundo grupo funcional que es un grupo terminal del dendrímero u otro polímero hiperramificado.

En la figura 5 se muestra cómo varios dendrímeros u otros polímeros hiperramificados podrían estar interconectados entre sí, antes de la funcionalización, mediante heparina u otra entidad anticoagulante.

En la figura 6 se muestra cómo varios dendrímeros u otros polímeros hiperramificados que se han funcionalizado con heparina u otra entidad anticoagulante podrían estar interconectados el uno con el otro.

En la figura 7 hay una representación esquemática de los componentes de la invención. Se muestra cómo los polímeros hiperramificados, que llevan entidades anticoagulantes en la capa externa del revestimiento, interaccionan (lo que implica enlaces covalentes y/o interacciones iónicas) con la capa interna y otros polímeros hiperramificados en la capa externa del revestimiento.

En la figura 8 se muestra el porcentaje de plaquetas que quedan en la sangre después de entrar en contacto con diferentes revestimientos no trombogénicos (véase el ejemplo 6).

En la figura 9 se muestra una tinción de ejemplo con azul de toluidina de un tubo de PVC antes y después de revestirlo con un revestimiento que contiene heparina de acuerdo con la invención (véase el ejemplo 3.2 y el ejemplo 6.3). En la figura 9; placa A: Antes; placa B: Después.

En la figura 10 se muestra el porcentaje de plaquetas que quedan en la sangre después de ponerla en contacto con diferentes revestimientos no trombogénicos (véase el ejemplo 11).

Descripción detallada de la invención

Entidades anticoagulantes

Una entidad anticoagulante es una entidad capaz de interaccionar con la sangre de mamífero para impedir la coagulación o la formación de trombos.

Las entidades anticoagulantes las conocen bien los expertos en la técnica y muchas de ellas son oligosacáridos o polisacáridos. Algunas de las entidades son glucosaminoglucanos, que incluyen los compuestos que contienen glucosamina, galactosamina y/o ácido urónico. Entre los glucosaminoglucanos más idóneos están los «restos de heparina» y, en particular, la heparina completa (a saber, heparina nativa).

El término «resto de heparina» hace referencia a una molécula de heparina, a un fragmento de la molécula de heparina o a un derivado o análogo de heparina. Los derivados de heparina pueden tener cualquier variación funcional o estructural de la heparina. Las variaciones representativas incluyen sales de heparina de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, tales como heparina de sodio (p. ej., Hepsal o Pularin), heparina de potasio (p. ej., Clarin), heparina de litio, heparina de calcio (p. ej., Calciparine), heparina de magnesio (p. ej., Cutheparine) y heparina de masa molecular baja (preparada mediante, p. ej., despolimerización oxidativa o escisión desaminativa, p. ej., Ardeparin sodium o Dalteparin). Otros ejemplos incluyen sulfato de heparano, heparinoides, compuestos basados en la heparina y heparina que tienen un contraión hidrófobo. Otras entidades anticoagulantes deseables incluyen composiciones con heparina sintética denominadas composiciones de «fondaparinux» (p. ej., Arixtra de GlaxoSmithKline) que implican la inhibición del factor Xa mediada por la antitrombina. Otros derivados de la heparina incluyen heparinas y restos de heparina modificados por medio de p. ej., la degradación suave con ácido nitroso (patente de los EE. UU. US 4.613.665) o la oxidación con peryodato (patente de los EE. UU. US 6.653.457) y otras reacciones de modificación conocidas en la técnica, en donde se conserva la bioactividad del resto de heparina.

Los restos de heparina también incluyen tales restos fijados a un conector o espaciador, tal y como está descrito más abajo. La heparina desulfatada, o la heparina funcionalizada a través, p. ej., del grupo carboxilato del resto de

ácido urónico, son menos idóneas que otras formas de heparina debido a que sus propiedades anticoagulantes están por lo general reducidas con respecto a otras formas de heparina. Los grados de monofuncionalización o de baja funcionalización de los grupos carboxilato puede ser aceptable siempre y cuando se conserve la bioactividad de la heparina.

- 5 Cada resto de heparina está unida por un único punto, en el extremo, a una molécula del polímero hiperramificado. La unión es a través de grupos terminales funcionales sobre la molécula del polímero hiperramificado, tal y como se explica más abajo. El resto de heparina es un resto de heparina unido en un extremo y está conectado a la molécula del polímero hiperramificado a través de su extremo reductor (a veces se le denomina posición C1 del extremo reductor). La ventaja de la unión terminal, en particular la unión al extremo reductor, es que la actividad biológica del
- 10 resto de heparina se eleva al máximo debido a que se mejora la disponibilidad de los sitios de interacción de la antitrombina en comparación con la unión en otra posición del resto de heparina.

Cuando hay numerosos restos de heparina, es posible que algunos o todos ellos sean de un tipo diferente; sin embargo, por lo general serán del mismo tipo. Los restos de heparina son aniónicos.

- 15 También se describen otras entidades anticoagulantes, tales como hirudina, coumadinas (antagonistas de la vitamina K de la clase de 4-hidroxycoumarina, como la warfarina), fármacos antiplaquetarios (tal como clopidogrel y abciximab), argatrobán, trombomodulina o proteínas anticoagulantes (tales como las proteínas C, S o antitrombina). Las entidades anticoagulantes también podrían incluir enzimas, tales como la apirasa. Tales sustancias podrían estar cargadas (p. ej., aniónicas) o sin cargar. El modo en el que estas se podrían unir al polímero hiperramificado para que se conserve su bioactividad lo puede diseñar cualquiera que sea experto en la técnica.

20 **Polímeros hiperramificados**

- En la figura 1 se muestran esquemáticamente ejemplos de diferentes tipos de polímeros hiperramificados, tipos A a D. A, en la figura 1, representa un polímero con puntos de ramificación (teóricamente) en cada unidad monomérica; B representa un polímero ramificado cuyo esqueleto es lineal y con enclavamientos ramificados, llamados dendrones, fijados a este; C representa un polímero con unidades de ramificación incorporadas en los segmentos
- 25 lineales; y D representa un dendrímero. Los polímeros no dendríméricos son ejemplos de polímeros hiperramificados útiles en el contexto de la presente invención si el segmento central es suficientemente pequeño con respecto al tamaño global de la molécula.

- La terminología «molécula del polímero hiperramificado» se conoce bien en la técnica que se refiere a una molécula que tiene una estructura ramificada de tipo árbol que emana de un resto central que está típicamente en el centro. En el contexto de la invención reivindicada en el presente documento, el polímero hiperramificado no es un dendrímero. Los dendrímeros, que se conocen bien, son moléculas de polímeros hiperramificados en los que el grado de ramificación es del 100% (de vez en cuando se denominan en la presente memoria «perfectamente ramificados», a saber, el 100% de los grupos funcionales capaces de ramificarse están ramificados) y que son, por lo tanto, muy simétricos con respecto al centro.

- 35 Los polímeros hiperramificados consisten en tres componentes arquitecturales básicos, (i) el centro, (ii) el interior y (iii) los grupos funcionales terminales. El centro se localiza en el centro de la molécula y están unidos a él los enclavamientos ramificados, denominados dendrones. Los dendrones están perfectamente ramificados o menos que perfectamente ramificados.

- El centro de una molécula de polímero hiperramificado es polifuncional (con varias funcionalidades del mismo tipo o bien con varias funcionalidades de diferentes tipos) y el número de grupos funcionales que lleva dictamina el número de ramificaciones posibles a introducir en la molécula. Típicamente todos los grupos funcionales del centro se utilizan en la ramificación. De igual manera, la forma de una molécula de polímero hiperramificado está determinada por la forma del centro, con centros sustancialmente tetrahédricos que dan lugar a moléculas del polímero hiperramificado sustancialmente esféricas y con centros más alargados que dan lugar a moléculas del polímero
- 45 hiperramificado ovoideas o con forma de barra.

De acuerdo con la invención, el resto del centro será una entidad relativamente pequeña con respecto al tamaño global del polímero, y tiene una masa molecular entre 14 y 1.000 Da, más habitualmente entre 40 y 300 Da y, por ejemplo, de 50 a 130 Da.

- Los dendrímeros son moléculas perfectamente ramificadas en las que el grado de ramificación es del 100%, con lo que su estructura es muy regular y, por lo tanto, para un material de partida dado, la única variable es el número de capas o generaciones en el dendrímero. Las generaciones están numeradas convencionalmente hacia fuera desde el centro. Véanse, por ejemplo, las tablas 2 a 4 que aparecen más adelante. En la figura 2 se ilustra un dendrímero de tercera generación y en la figura 3 se ilustra un dendrímero de segunda generación. Debido a su estructura muy uniforme y simétrica, la distribución de la masa molecular para los dendrímeros de una generación dada es muy estrecha, lo cual es muy ventajoso ya que conduce a un producto muy uniforme.
- 50
- 55

Otras moléculas hiperramificadas también contienen un elevado número de ramificaciones, aunque, y, por ejemplo, el grado de ramificación se encontrará habitualmente en al menos el 30%, 40% o 50%, por ejemplo, al menos el

60%, 70%, 80% o 90%. A diferencia de los dendrímeros, la estructura de tales moléculas hiperramificadas no será completamente regular, sino que pueden también adoptar una estructura globular a grandes rasgos.

Típicamente, el centro es el resto de una molécula que no es la misma que la unidad o unidades de repetición del polímero. Sin embargo, en una realización, el centro es un resto del mismo tipo que la unidad de repetición (o una de las unidades de repetición) del polímero.

Las moléculas del polímero hiperramificado se preparan por lo general mediante el empleo de un método divergente, en el que las capas se construyen a partir de un centro, o bien mediante un método convergente en el que los fragmentos se construyen primero y luego se condensan. Los dendrímeros se suelen preparar habitualmente con el método divergente.

En la síntesis de dendrímeros, es esencial un alto grado de control sobre la reacción de adición de cada unidad de ramificación, y los productos resultantes muestran un índice de polidispersidad (IPD) entre 1,00 y 1,05. El tamaño de los dendrones depende del número de capas de monómero y cada capa añadida se representa mediante una generación (G). El interior consiste en monómeros ramificados que tienen una funcionalidad AB_x, donde $x \geq 2$. La preparación cuidadosa de la unidad de ramificación permite controlar la reacción entre A y B' si B' es el estado activado de B. Los dendrímeros más grandes originan, como resultado, estructuras de tamaño de nanoescala, con forma globular y con una viscosidad intrínseca baja.

Tradicionalmente, los dendrímeros se sintetizan con el empleo de una técnica iterativa, donde los monómeros AB_x se añaden de manera alternada a las especies en crecimiento seguido de una etapa de activación/desprotección. Estos protocolos dependen de reacciones eficaces que garantizan una sustitución completa de los grupos B' terminales. Cualquier desviación dará defectos estructurales que se acumularán durante el crecimiento de los dendrímeros, lo que dará lugar a procedimientos de purificación tediosos o imposibles.

Véase *Aldrichimica Acta* (2004) 37 (2), 1-52 «Dendrimers: building blocks for nanoscale synthesis», p. ej., en las páginas 42 a 43, para más detalles sobre la síntesis de dendrímeros y la nomenclatura.

Los polímeros hiperramificados que no son dendrímeros podrían, por ejemplo, formarse mediante la polimerización de un monómero reactivo o más de un monómero reactivo. Por ejemplo, los polímeros hiperramificados que son poliaminas se podrían preparar mediante la polimerización de la aziridina, por ejemplo, mediante el tratamiento con una base.

Los restos centrales de ejemplo incluyen aminas, tales como el resto de amonio (masa molecular de 14 Da), diaminas (p. ej., etilendiamina (masa molecular de 56 Da), propilendiamina (masa molecular de 70 Da) o 1,4-diaminobutano (masa molecular de 84 Da)), y triaminas (p. ej., dietilentriamina (NCH₂CH₂NHCH₂CH₂N) (masa molecular de 99 Da) o 1,2,3-triaminopropano (89 Da)). Otros centros podrían contener oxígeno, entre ellos C(Me)(CH₂O)₃ (masa molecular de 117 Da) o contener azufre, entre ellos (NCH₂CH₂S-SCH₂CH₂N) (masa molecular de 148 Da).

Los polímeros hiperramificados catiónicos tendrán una carga predominantemente positiva a aproximadamente pH 7, es decir, o contienen solo grupos sin cargar y grupos cargados que tienen una carga positiva a pH 7, o bien (menos preferido) tienen grupos que están cargados negativamente a pH 7 cuyo número se ve superado por el de los grupos que están cargados positivamente. Los polímeros hiperramificados catiónicos de esta invención tendrán típicamente aminas primarias como grupos funcionales terminales.

Los polímeros hiperramificados para ser usados de acuerdo con la invención podrían contener numerosas funcionalidades, por ejemplo, podrían ser poliaminas (que contienen total o sustancialmente grupos de amina secundaria y terciaria, y con aminas primarias como grupos funcionales terminales), poliamidoaminas (grupos amida y grupos de amina secundaria y terciaria, y con aminas primarias como grupos funcionales terminales) o poliéteres con funcionalidad de amina (p. ej., poliéteres tales como PEG en los que los grupos terminales han sido transformados en grupos de amina primaria).

Se describe una familia de polímeros hiperramificados que con poliamidoaminas (PAMAM) en las que un resto de amonio o una di- o triamina (p. ej., etilendiamina) se podría utilizar como el resto central y la adición de generaciones de molécula ramificada se podría construir al hacer reaccionar el amonio o los grupos amina libres con, p. ej., acrilato de metilo seguido de etilendiamina, lo que conduce a una estructura que tiene numerosos grupos amina libres en la superficie externa. Se pueden construir generaciones posteriores mediante la reacción adicional con acrilato de metilo y etilendiamina. Será un dendrímero toda estructura en la que todos los grupos de amina primaria de las capas internas se han hecho reaccionar con acrilato de metilo y etilendiamina. Los dendrímeros de PAMAM están disponibles con la marca comercial Starburst®, fabricada por Dendritech Inc. Los dendrímeros Starburst los vende Dendritech Inc., Sigma Aldrich y Dendritic Nanotechnologies (DNT).

Los polímeros hiperramificados de ejemplo podrían incluir poliaminas, tales como polímeros de polipropilenimina (PPI) y polietilenimina (PEI) formados por la polimerización de los correspondientes elementos fundamentales. Los polímeros hiperramificados a base de PPI también se podrían sintetizar a partir de un centro, tal como diaminobutano, y construirse mediante la reacción de los grupos de amina primaria con acrilonitrilo seguido de

hidrogenación. Los dendrímeros de PPI están disponibles en la marca comercial Astramol™ y los proporcionan DSM y Sigma Aldrich. Los polímeros de polietilenimina (PEI) están disponibles de, p. ej., BASF, Nippon Shokubai y Wuhan Bright Chemical.

- 5 Así pues, el polímero hiperramificado se podría seleccionar de poliamidoamina, polipropilenimina, polietilenimina y otros polímeros y copolímeros de poliamina que comprenden uno o más de poliamidoamina, polipropilenimina, polietilenimina y polímeros hiperramificados de poliamina.

En general, los polímeros hiperramificados catiónicos que tienen grupos de amina primaria como grupos funcionales terminales, por ejemplo, polietileniminas o polipropileniminas, son idóneos en particular para ser usados en la presente invención.

- 10 Los polímeros aminados hiperramificados que comprenden ésteres, carbonatos, anhídridos y poliuretanos son menos idóneos ya que tienden a degradarse. Sin embargo, la bioestabilidad puede depender del número y la proporción de grupos biodegradables y algunos podrían de esta forma ser idóneos dentro de esta invención.

Las propiedades de determinados polímeros hiperramificados se describen en la tabla 1 que viene a continuación:

Tabla 1

Ejemplos de polímeros hiperramificados con la razón adecuada de masa molecular total por masa molecular del resto central					
Tipo	Proveedor	Marca comercial	Centro	Masa molecular [Da]	Razón
PEI	BASF	Lupasol® WF	Etano-1,2-diamina (masa molecular: 56 Da)	25.000	~ 450:1
PAMAM	Dendritech DNT Sigma Aldrich	Starburst® G3-G10	Etano-1,2-diamina (masa molecular: 56 Da)	7.000 - 935.000 (p. ej., 7.000-900.000)	~ 125:1 - 16.700:1
PPI	DSM Sigma Aldrich	Astramol™ Am-64	Butano-1,4-diamina (masa molecular: 84 Da)	7.000	~ 85:1
PEI	Nippon Shokubai	Epomin-P-1050	Etano-1,2-diamina (masa molecular: 56 Da)	70.000	~ 1250:1
PEI	Wuhan Bright Chemical	G-35	Etano-1,2-diamina (masa molecular: 56 Da)	70.000	~ 1250:1
Ejemplos de polímeros con otros tipos de estructura (polímeros hiperramificados no idóneos dentro de los términos de la presente invención)					
Tipo	Fabricante	Marca comercial	Centro	Masa molecular [Da]	Razón
PEI	BASF	Lupasol® SN	Sin definir, polimérico	1.000.000	N/A
PEI	BASF	Lupasol® SK	Sin definir, polimérico	2.000.000	N/A
PEI	Wuhan Bright Chemical	G-35	Etano-1,2-diamina (masa molecular: 56 Da)	1.500	~ 25:1
PAMAM	Dendritech DNT	Starburst® G1	Etano-1,2-diamina (masa molecular: 56 Da)	1.430	~ 26:1

Ejemplos de polímeros hiperramificados con la razón adecuada de masa molecular total por masa molecular del resto central

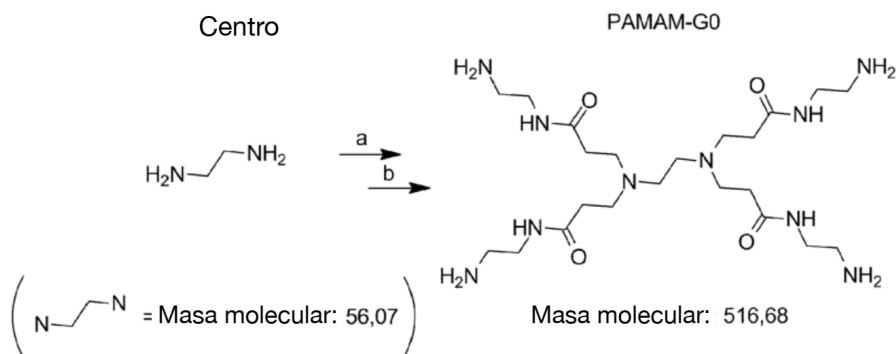
	Sigma Aldrich				
PPI	DSM	Astramol™ Am-8	Butano-1,4-diamina (masa molecular: 84 Da)	316	~ 4:1

La PAMAM ilustrada en la figura 2 se basa en la etilendiamina como resto central. Las propiedades según el número de generaciones construidas se describen en la tabla 2 que viene a continuación:

Tabla 2

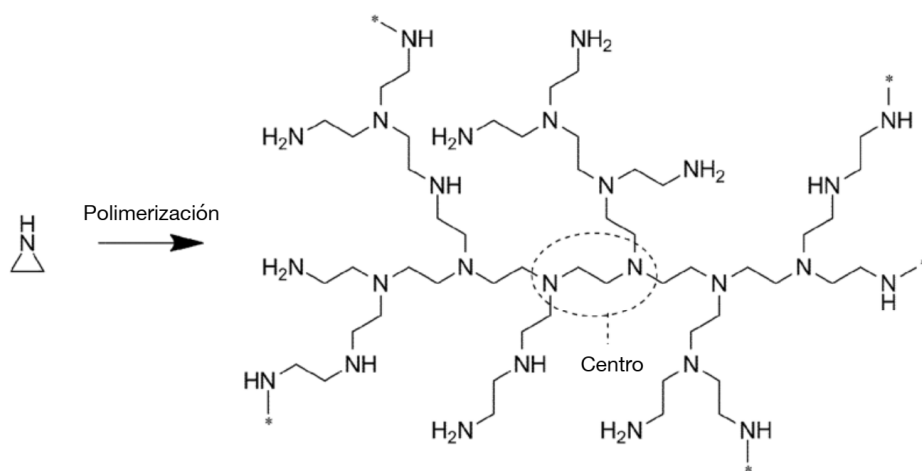
Generación	Masa molecular (Da)	Diámetro medido (Å)	Número de grupos de la superficie	Relación de la masa molecular total por la masa molecular del centro
Centro/G0	56 / 517*	15	4	~ 9:1
1	1.430	22	8	~ 26:1
2	3.256	29	16	~ 58:1
3	6.909	36	32	~ 125:1
4	14.215	45	64	~ 250:1
5	28.826	54	128	~ 515:1
6	58.048	67	256	~ 1.040:1
7	116.493	81	512	~ 2.080:1
8	233.383	97	1.024	~ 4.170:1
9	467.162	114	2.048	~ 8.340:1
10	934.720	135	4.096	~ 16.700:1

Véase *Aldrichimica Acta* (2004) 37 (2), 1-52 «Dendrimers: building blocks for nanoscale synthesis» *Structure, véase el esquema 1



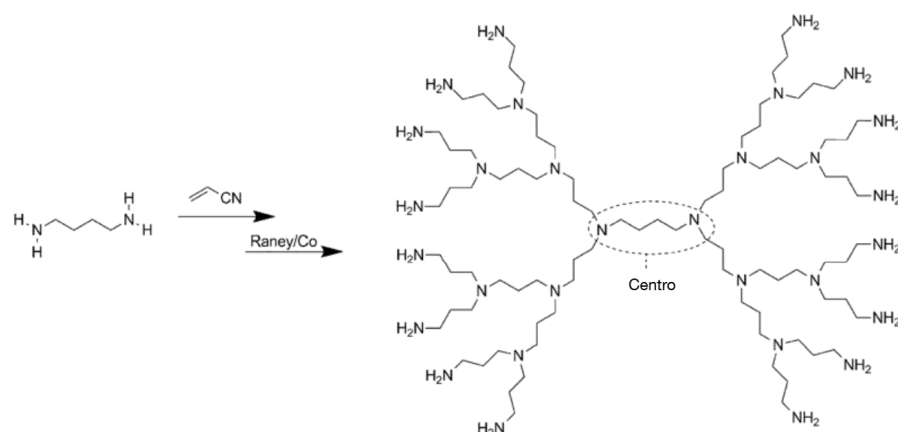
Esquema 1. Síntesis de un dendrímero de PAMAM-G0. En el esquema 1: a es un acrilato de metilo y b es etano-1,2-diamina.

En el esquema 2 se muestra la síntesis de un polímero hiperramificado de PEI basado en un centro de etilendiamina mediante la polimerización de la aziridina.



Esquema 2. Síntesis de un polímero hiperramificado de PEI. En el esquema 2: el polímero hiperramificado de PEI es de la 4.^a generación que tiene un centro de etano-1,2-diamina (masa molecular = 56 Da). * señala las posiciones de ejemplo donde se podrían añadir más monómeros de aziridina.

- 5 En el esquema 3 se muestra la síntesis de un dendrímero de PPI de ejemplo basado en un centro de butano-1,4-diamina mediante la polimerización del acrilonitrilo.



Esquema 3. Síntesis del dendrímero de PPI. En el esquema 3: el dendrímero de PPI es de 3.^a generación, que tiene un centro de butano-1,4-diamina (masa molecular = 84 Da).

Las moléculas de los polímeros hiperramificados útiles en la presente invención tienen una masa molecular de aproximadamente 10.000 a 300.000 Da, p. ej., aproximadamente de 25.000 a 200.000 Da. Las moléculas de polímero hiperramificado útiles en la presente invención tienen idóneamente una forma sustancialmente esférica. Típicamente, tienen un diámetro de aproximadamente 2 a 100 nm, p. ej., de 2 a 30 nm, en particular de aproximadamente 5 a 30 nm, tal y como se determina mediante dispersión óptica con láser.

Un dendrímero de PAMAM tiene típicamente una masa molecular de aproximadamente 5.000 a 1.000.000 Da, más típicamente de aproximadamente 12.000 a 125.000 Da, y un diámetro de aproximadamente 1 a 20 nm, p. ej., de 2 a 10 nm, en particular de aproximadamente 4 a 9 nm.

En los polímeros hiperramificados para ser usados de acuerdo con la invención, la razón de masa molecular total por masa molecular del resto central es al menos de 80:1, por ejemplo al menos 100:1, por ejemplo al menos 200:1, p. ej., al menos 500:1, p. ej., al menos 1000:1. La razón es típicamente menor que 20.000:1, p. ej., menor que 10.000:1, p. ej., menor que 5.000:1. Por ejemplo, la razón está entre 80:1 y 20.000:1, p. ej., 200:1 y 5.000:1, p. ej., entre 200:1 y 1.600:1, p. ej., entre 400:1 y 1.600:1.

Para eliminar cualquier duda, la masa molecular total del polímero hiperramificado al que se hace referencia en la presente memoria excluye la masa de cualquier resto de heparina, o cualquier agente beneficioso, que esté unido covalentemente.

La razón viene dictaminada por la masa molecular del centro y la masa molecular total del polímero hiperramificado. La razón calculada variará a medida que varíe el centro (en términos de la composición química y la masa molecular) y a medida que varíe la masa molecular de las generaciones (en términos de masa molecular de los monómeros y el número de monómeros unidos en cada generación).

Se describen dendrímeros de PAMAM con un centro derivado de la etano-1,2-diamina y el número de generaciones está preferiblemente entre 3 y 10, más preferiblemente entre 4 y 7, a saber, 4, 5, 6 o 7.

Se describen polímeros hiperramificados de PAMAM con un centro derivado de la etilendiamina y el número de monómeros reactivos incorporados (acrilato de metilo, masa molecular = 56 Da, y etilendiamina, masa molecular = 57 Da) en el polímero hiperramificado está a modo de ejemplo entre 50 y 9.000, p. ej., entre 100 y 5.000, p. ej., entre 100 y 2.000, de cada monómero.

Para los polímeros hiperramificados de PEI, se prefiere un centro derivado de etilendiamina y el número de monómeros de aziridina (masa molecular = 42 Da) incorporados en el polímero hiperramificado está a modo de ejemplo entre 110 y 20.000, p. ej., entre 110 y 10.000, p. ej., entre 110 y 3.000, monómeros.

Para los polímeros hiperramificados de PPI, se prefiere un centro derivado de butano-1,4-diamina y el número de monómeros de acrilonitrilo (masa molecular = 56 Da) incorporados en el polímero hiperramificado está a modo de ejemplo entre 120 y 17.000, p. ej., entre 120 y 4.000, p. ej., entre 120 y 1.000, monómeros.

En el dispositivo de la presente invención, las muchas moléculas del polímero hiperramificado catiónico podrían estar optativamente interconectadas entre sí sobre la superficie del dispositivo. La interconexión podría tener lugar antes o bien después de que las moléculas del polímero hiperramificado se apliquen en la superficie del dispositivo y antes o bien después de que los restos de heparina se unan a esta (véanse las figuras 5, 6).

En el caso en el que las moléculas del polímero hiperramificado estén interconectadas, el número de moléculas que se podrían interconectar para formar un polímero hiperramificado agregado es de dos o más, por ejemplo, de 2 a 500, p. ej., de 2 a 10, tal como de 2 a 5; y cada molécula podría estar unida a otra molécula del agregado mediante una o más interconexiones, p. ej., hasta 10 interconexiones.

Los agregados de 2 o más moléculas del polímero hiperramificado útiles en la presente invención tienen típicamente una masa molecular de aproximadamente 3.000 a 2.000.000 Da, más típicamente de aproximadamente 50.000 a 500.000 Da. Los agregados de polímeros hiperramificados útiles en la presente invención tienen típicamente un diámetro de aproximadamente 5 a 100 nm, en particular de aproximadamente 20 a 100 nm.

Modificación de moléculas del polímero hiperramificado con entidades anticoagulantes

Las moléculas del polímero hiperramificado tienen un gran número de grupos funcionales terminales que se pueden hacer reaccionar con entidades anticoagulantes, tales como la heparina (véase la figura 4). Los grupos funcionales terminales pueden ser del mismo tipo o de varios tipos diferentes, como resulte más apropiado. Por lo tanto, una de las ventajas de la presente invención es que es posible diseñar la molécula para que tenga un número necesario de grupos funcionales terminales de una funcionalidad específica. Esto hace posible inmovilizar de manera selectiva la cantidad deseada de restos de heparina sobre la superficie de un dispositivo sin interferir con la construcción de las capas internas.

La estructura ramificante de las moléculas hiperramificadas hace posible la obtención de una densidad superficial de los restos de heparina más alta de lo que era posible mediante el uso de estructuras de polímeros esencialmente

lineales, mientras que se consigue un espaciado suficiente de los restos de heparina para garantizar que la biodisponibilidad de cada resto no se ve reducida en comparación con la conseguida mediante el uso de los revestimientos ya conocidos y podría incrementarse realmente.

Otra peculiaridad útil de los polímeros hiperramificados es que la mayoría de los grupos funcionales terminales reactivos están en la superficie de la molécula hiperramificada y, por lo tanto, sustancialmente todo el resto de heparina está disponible sobre la superficie del polímero hiperramificado. Esta peculiaridad ofrece una ventaja particular frente a los polímeros de revestimiento convencionales, en los que muchos de los grupos funcionales terminales reactivos podrían quedar ocultos en el interior de la estructura en vez de quedar expuestos en la superficie. Esto significa que el resto de heparina que reacciona con los grupos funcionales en tales polímeros convencionales de revestimiento podría quedar inmovilizado en los intersticios de la superficie del polímero y no estará biodisponible.

La arquitectura del polímero hiperramificado modificado permitirá una distribución más homogénea del resto de heparina a lo largo de las capas en las que se incorpore, tal como la capa externa del revestimiento, que debe dar lugar, en principio, a un incremento de la estabilidad con el tiempo. Además, la posibilidad de seleccionar y ajustar la densidad de la heparina sobre el polímero hiperramificado permitirá una distribución de la heparina más robusta y predecible sobre el dispositivo. La fabricación previa del conjugado entre el polímero hiperramificado y el resto de heparina también disminuye la variabilidad entre los lotes, ya que es más fácil ajustar el grado de sustitución del polímero hiperramificado mediante el resto de heparina en solución que sobre la superficie.

Se da a conocer una molécula de polímero hiperramificado y catiónico que se caracteriza por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 10.000 a 300.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1, y (iv) grupos funcionales terminales, gracias a lo cual uno o varios de dichos grupos funcionales terminales tienen un resto de heparina covalentemente unido por un único punto a ellos, en donde dicho resto de heparina está unido covalentemente por un único punto a la molécula de polímero hiperramificado a través del extremo reductor del resto de heparina, y en donde el polímero hiperramificado no es un dendrímero.

Según el número de restos de heparina unidos a los grupos funcionales terminales, y su carga negativa, el polímero hiperramificado catiónico podría tener una carga neta positiva o una carga neta negativa.

Idóneamente, el resto de heparina tiene una conexión covalente sólo con un único grupo funcional terminal sobre una molécula de polímero hiperramificado y no con cualquier otra molécula. El acoplamiento del resto de heparina nunca es al centro del polímero hiperramificado, solo a un grupo funcional terminal del polímero hiperramificado.

El número de grupos funcionales terminales que tienen un resto de heparina fijado covalentemente a ellos es uno o más, por ejemplo, 2 o más, por ejemplo, de 2 a 200, p. ej., de 10 a 100, aunque no hay un límite superior específico. El número que se podría unir dependerá del número de grupos terminales que están disponibles, que está en función del tamaño de la molécula de polímero hiperramificado catiónico. El número de grupos funcionales terminales que tienen un resto de heparina unido covalentemente a ellos podría ser, por ejemplo, del 1 al 95%, p. ej., del 5 al 95%, p. ej., del 10 al 80%, p. ej., del 10 al 50%, de los grupos funcionales terminales disponibles. El número de grupos funcionales terminales que tienen un resto de heparina unido covalentemente a ellos podría ser, por ejemplo, del 5 al 50%, p. ej., del 5 al 40%, p. ej., del 5 al 30%, p. ej., aproximadamente el 25%, de los grupos funcionales terminales disponibles. Para los restos de heparina aniónicos, el número que se podría unir dependerá también de si se desea que el polímero hiperramificado modificado resultante tenga una carga neta positiva (en cuyo caso, no deben fijarse covalentemente demasiados restos de heparina aniónicos) o una carga neta negativa.

Acoplamiento del resto de heparina al polímero hiperramificado catiónico

Típicamente, cada resto de heparina está conectado covalentemente a un polímero hiperramificado catiónico a través de un conector y, optativamente, uno o varios espaciadores. El conector está formado por la reacción de un grupo funcional terminal sobre el polímero hiperramificado con un grupo funcional sobre el resto de heparina. En la tabla 3 y en el esquema 4 se muestran ejemplos de algunos tipos de conectores idóneos para fijar el resto de heparina al polímero hiperramificado junto con los grupos funcionales a partir de los cuales se forma el conector covalente y el tipo de reacción utilizado. Véase, p. ej., la referencia (ISBN: 978-0-12-370501-3, *Bioconjugate techniques*, 2ª ed. 2008). Sin embargo, también se podrían contemplar las reacciones de acoplamiento con radicales.

Para cada conector, uno de los grupos funcionales terminales se encuentra en el polímero hiperramificado y el otro se encuentra en el resto de heparina. En principio, es posible evitarlo de muchas maneras, a saber, por referencia a la tabla 3, los grupos funcionales 1 y 2 podrían, respectivamente, estar sobre el polímero hiperramificado y sobre el resto de heparina, o bien podrían, respectivamente, estar sobre el resto de heparina y sobre el polímero hiperramificado.

En algunos casos, el resto de heparina y el polímero hiperramificado podrían quedar unidos por un conector que comprende más de un grupo funcional. Por ejemplo, en el caso en el que el conector sea un tioéter, una molécula bifuncional (que tiene, por ejemplo, un grupo SH en cada extremo) puede estar conectada en cada extremo,

- respectivamente, a un resto de heparina funcionalizado con alquino/alqueno y una molécula de polímero hiperramificado funcionalizado con alquino/alqueno que da lugar a que el conector contenga dos tioéteres. Como alternativa, se puede conectar una molécula de bis-alquino/alqueno en cada extremo, respectivamente, a un resto de heparina funcionalizado con tiol y un polímero hiperramificado funcionalizado con tiol que también da lugar a un conector que contiene dos tioéteres. Existen posibilidades similares para otros tipos de conectores, tal y como queda claro a partir de la tabla 3. El polímero hiperramificado también podría llevar dos o más grupos funcionales diferentes, por ejemplo, funcionalidad de amina y alquino, de tal manera que los restos de heparina se podrían fijar a los grupos funcionales terminales del polímero hiperramificado a través de más de un tipo de conector, aunque nosotros preferimos unir los restos de heparina mediante el uso de un tipo de conector.
- 10 El resto conector tendrá típicamente una masa molecular de aproximadamente 14 a 200, p. ej., 14 a 100, Da.

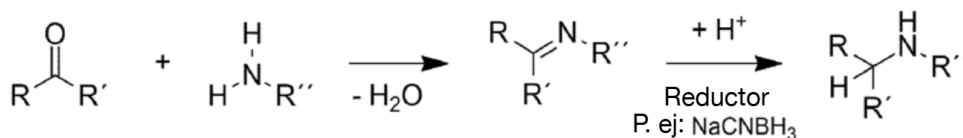
Tabla 3

Tipo de reacción	Grupo func. 1	Grupo func. 2	Conector	Tipo de reacción	Grupo func. 1	Grupo func. 2	Conector
Aminación reductiva				Tio-Bromo			
Amidación				Clic de Tio-Iso			
Adición Michael				Clic de CuAAC			
Adición Michael				Amidación activado (NHS-)			
Clic de Tio-Eno				Amidación/Disulfuro (SPDP)			

A continuación, se explican las químicas ilustrativas que se muestran en la tabla 3 y en el esquema 4:

Enlace -C-NH-C-

- 15 Aminación reductiva: Una aminación reductiva, conocida también como alquilación reductiva, es una forma de aminación que implica la conversión de un grupo carbonilo en un conector amina a través de un intermedio imina (base de Schiff). Lo más habitual es que el grupo carbonilo sea una cetona o un aldehído.



Esquema 4. Aminación reductiva

Enlace -C-NH-CHR-CHR-C(=O)-

- 20 Adición de Michael: La reacción de Michael o la adición de Michael es la adición nucleófila de un carbanión u otro nucleófilo (p. ej., amina primaria o tiol) a un compuesto de carbonilo α,β-insaturado. Pertenecen a la clase más grande de adiciones de conjugación. Este es uno de los métodos más útiles para la formación suave de enlaces C-C.

Enlace -C-S-C-

- 25 Tio-bromo: Los enlaces tioéter se preparan típicamente mediante la alquilación de tioles. Los tioles podrían reaccionar con compuestos de bromuro para generar los enlaces tioéter. Tales reacciones se suelen llevar a cabo en presencia de una base, que convierte el tiol en tiolato, que es más nucleófilo.

Tiol-eno y tiol-ino: Como alternativa, se podrían preparar enlaces tioéter mediante la reacción de un primer compuesto que contiene un grupo tiol con un segundo compuesto que contiene un grupo alqueno o uno alquino. Los

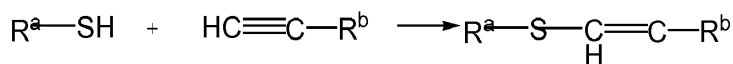
compuestos primero y segundo pueden ser cada uno la molécula de polímero hiperramificado y el resto de heparina, como resulte más apropiado.

Idóneamente, la reacción tiene lugar en presencia de un reductor, tal como hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina, o, como alternativa, ditiotretol o borohidruro de sodio, para evitar o revertir la eficacia del acoplamiento indeseado de dos grupos tiol a través de la oxidación.

En una realización, la reacción se inicia con un radical iniciador. Un ejemplo de radical iniciador es el 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléico). Otros ejemplos son persulfato de potasio, dihidrocloreto de 2,2'-azobis[2-(2-imidazolín-2-il)propano], azobisisobutironitrilo (AIBN), dihidrocloreto de 1,2-bis(2-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)propán-2-il)diazeno, dihidrocloreto de 2,2'-(diazeno-1,2-diil)bis(2-metil-1-(pirrolidín-1-il)propán-1-imina), tetrahidrato del ácido 3,3'-((diazeno-1,2-diilbis(1-imino-2-metilpropano-2,1-diil))bis(azanodiil))dipropanoico, benzofenona y derivados de benzofenona, tal como cloruro de 4-(trimetilamonioetil)benzofenona. Un ejemplo más es el persulfato de amonio.

En otra realización, la reacción no se inicia con un radical iniciador. En cambio, se utilizan condiciones de pH más alto (p. ej., pH 8-11). Este tipo de reacción es más idóneo cuando se utiliza un alqueno o alquino activado para la reacción con el tiol.

La reacción entre un primer compuesto que contiene un grupo tiol y un segundo compuesto que contiene un grupo alquino se podría representar de la manera siguiente:

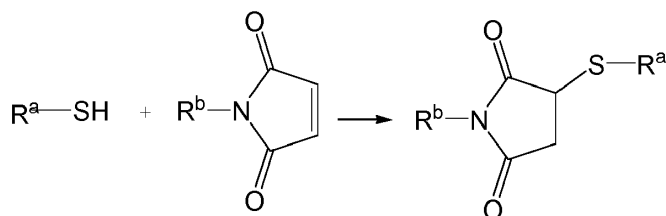


en donde uno de R^a y R^b es la poliamina hiperramificada y el otro de R^a y R^b es el resto de heparina.

Cuando se forma un conector que contiene alqueno, este compuesto podría sufrir una transformación química adicional con, p. ej., un tiol (tal y como se muestra en la tabla 3) o una amina.

Cuando el segundo compuesto se modifica con un alqueno, en una realización se utiliza un alqueno activado. Un ejemplo de un alqueno activado idóneo es una modificación con maleimida.

La reacción entre un primer compuesto que contiene un grupo tiol y un segundo compuesto que contiene un grupo maleimida se podría representar de la manera siguiente:



donde uno de R^a y R^b es el polímero y el otro de R^a y R^b es el resto de heparina. Por lo general, la reacción se lleva a cabo en presencia de hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina como reductor y 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléico) como radical iniciador, y en condiciones ácidas.

Enlace triazol (acoplamiento de CuAAC)

Azida-alquino: se podrían preparar enlaces de 1,2,3-triazol al hacer reaccionar un alquino y un compuesto con azido. La reacción para formar el conector podría ser entre un grupo alquino sobre uno de los restos de heparina y la molécula del polímero hiperramificado, y un grupo azido sobre el otro del resto de heparina y la molécula del polímero hiperramificado. Los métodos para llevar a cabo esta reacción son parecidos a los métodos que se describen en la solicitud de patente internacional WO 2010/029189.

La reacción entre la azida y los grupos alquino se podría llevar a cabo a temperaturas elevadas ($T > 60^\circ\text{C}$) o en presencia de un catalizador metálico, por ejemplo, cobre, p. ej., un catalizador de Cu(I) mediante el uso de las condiciones de reacción utilizadas convencionalmente en la cicloadición de Huisgen (la cicloadición 1,3-dipolar de una azida y un alquino terminal para formar un 1,2,3-triazol). El catalizador de Cu(I) podría, si se desea, producirse *in situ*, p. ej., mediante la reducción de un compuesto de Cu(II) correspondiente, por ejemplo, mediante el uso de ascorbato de sodio. La reacción también podría, si se desea, llevarse a cabo en las condiciones de flujo.

La reacción de CuAAC podría, por ejemplo, llevarse a cabo a una temperatura de aproximadamente 5 a 80°C , preferiblemente a aproximadamente la temperatura ambiente. El pH utilizado en la reacción podría ser de aproximadamente 2 a 12, preferiblemente de aproximadamente 4 a 9, y lo más preferiblemente aproximadamente 7. Los solventes idóneos incluyen aquellos en los que la entidad unida a la azida o al alquino es soluble, p. ej., dimetilsulfóxido, dimetilformamida, tetrahidrofurano y, preferiblemente, agua o mezclas de agua con uno de los

anteriores. La proporción del resto por la superficie se podría ajustar para proporcionar la densidad deseada del resto en la superficie.

Enlace -C(=O)-N-

5 Amidación: Las amidas se suelen formar mediante reacciones de un ácido carboxílico con una amina. El ácido carboxílico y los derivados del ácido carboxílico podrían someterse a muchas transformaciones químicas, normalmente a través de un ataque en el carbonilo que rompe el doble enlace del carbonilo y forma un intermedio tetrahédrico. Los tioles, alcoholes y aminas se sabe que sirven de nucleófilos. Las amidas son menos reactivas que los ésteres en las condiciones fisiológicas.

10 Amidación mediante el uso de ácido activado: Los ácidos activados (básicamente ésteres con un buen grupo saliente, p. ej., ácidos NHS-activados) pueden reaccionar con las aminas para formar conectores amídicos, en las condiciones en las que un ácido carboxílico normal solo formaría una sal.

Enlace -C-S-S-CH₂-CH₂-C(=O)-N-

15 Acoplamiento mediante reactivos de SPDP: El 3-(2-piridilditió)propionato de *N*-succinimidilo (SPDP) y sus análogos pertenecen a un grupo único de reactivos que forman enlaces heterobifuncionales que reaccionan con amina y tiol para producir enlaces que contienen un disulfuro.

La aminación reductiva, la adición de Michael, las reacciones de tio-bromo, la amidación mediante ácido NHS-activado, el acoplamiento con un reactivo de SPDP, los acoplamientos de CuAAC y tiol-eno, son todos idóneos para proporcionar condiciones de acoplamiento benignas y un rendimiento alto de formación de conectores.

20 Los agrupamientos que se muestran en la tabla 3 tienen propósitos ilustrativos sólo y, por supuesto, se podrían emplear funcionalidades alternativas o variantes. Por ejemplo, los grupos amina se podrían colocar en un carbono secundario o las cadenas alifáticas ilustradas se podrían remplazar por grupos aromáticos.

Reacciones iniciadas por radicales libres

25 Tal y como se mencionó brevemente más arriba, los grupos funcionales terminales de la molécula del polímero hiperramificado se podrían acoplar a un resto de heparina mediante un conector formado por una reacción iniciada por radicales libres. Los radicales se podrían crear, por ejemplo, por medio de calor, fotólisis (p. ej., reacciones de Norrish de tipo I y/o de Norrish de tipo II), ionización, oxidación, plasma o reacciones electroquímicas. Por ejemplo, cuando una molécula del polímero hiperramificado que tiene grupos de amina primaria libres se trata con benzofenona, se crean radicales, tales como, p. ej., radicales de carbono u oxígeno, que podrían participar en las reacciones iniciadas por radicales libres (tales como la reacción con alquenos).

30 En una realización, el conector covalente comprende un enlace de amina secundaria. En particular, el conector podría comprender un grupo -NH-;

En otra realización, el conector covalente comprende un enlace amida. En particular, el conector podría comprender un grupo -NH-C(O)-;

En otra realización, el conector covalente comprende un enlace tioéter.

35 En otra realización, el conector covalente comprende un enlace 1,2,3-triazol.

La terminología «enlace tioéter» hace referencia a una conexión entre un azufre y dos átomos de carbono. Esta conexión se denomina a veces un «sulfuro». El azufre podría estar unido a dos átomos de carbono saturados (a saber, -C-S-C-) o podría estar unido a un átomo de carbono saturado y uno insaturado (i.e. -C-S-C=).

La terminología «tiol» hace referencia a un resto -S-H.

40 La terminología «enlace de amina secundaria» hace referencia a una conexión entre un grupo NH y dos átomos de carbono, a saber, -C-NH-C-.

La terminología «enlace amida» hace referencia a una conexión entre dos átomos de carbono del tipo -C-C(O)NH-C-.

En una realización, el conector entre el resto de heparina y un grupo funcional terminal de la molécula del polímero hiperramificado es un conector sin ramificar.

45 El conector puede ser biodegradable o no biodegradable, pero es más idóneamente no biodegradable para que el dispositivo revestido no sea trombogénico durante un largo periodo de tiempo.

Cuando hay numerosos conectores, es posible que algunos o todos ellos sean de un tipo diferente.

En una realización, todos los conectores son del mismo tipo.

Espaciadores

Lo más simple es que la conexión covalente entre el grupo funcional terminal de la molécula del polímero hiperramificado y el resto de heparina sea a través de un conector, p. ej., tal y como se muestra en la tabla 3. Sin embargo, optativamente, el conector podría estar separado por un espaciador desde la superficie o bien desde el resto de heparina, o desde ambos.

El propósito del espaciador, si se emplea, suele ser para incrementar significativamente la separación entre la molécula del polímero hiperramificado y el resto de heparina, a saber, en efecto, para incrementar significativamente la separación entre la superficie del dispositivo y el resto de heparina. Por ejemplo, la masa molecular del espaciador podría ser de 50 a 10^6 Da, típicamente de 100 a 10^6 Da, p. ej., de 100 a 10^4 Da. La longitud del espaciador podría ser, por ejemplo, de 10 a 10^3 Å. Nosotros preferimos que el espaciador sea de cadena lineal. En algunas realizaciones, el espaciador es hidrófilo, por ejemplo, podría comprender una cadena de PEG. En un aspecto, la conexión covalente entre el grupo funcional terminal de la molécula del polímero hiperramificado y el resto de heparina podría verse como que tiene tres porciones: «espaciador A» entre el grupo funcional terminal de la molécula del polímero hiperramificado y el resto del conector, el resto del conector, y el «espaciador B» entre el resto del conector y el resto de heparina. En una realización, la masa molecular del espaciador A está entre 50 y 10^3 Da. En otra realización, la masa molecular del espaciador B está entre 50 y 10^3 Da. En una realización, el espaciador A comprende uno o varios anillos aromáticos. En otra realización, el espaciador A no comprende ningún anillo aromático. En una realización, el espaciador B comprende uno o varios anillos aromáticos. En otra realización, el espaciador B no comprende ningún anillo aromático. En una realización, el espaciador A es hidrófilo. En otra realización, el espaciador B es hidrófilo. En una realización, el espaciador A comprende una cadena de PEG. En otra realización, el espaciador B comprende una cadena de PEG. En una realización, los espaciadores A y B son hidrófilos los dos, por ejemplo, comprenden cada uno una cadena de PEG. Tal y como se emplea en esta memoria, una cadena de PEG hace referencia a una cadena polimérica que se puede obtener mediante la polimerización de óxido de etileno, típicamente con una masa entre 100 y 10^6 Da. En otro aspecto, la conexión covalente podría comprender dos o más anillos de triazol. En otra realización, la conexión covalente se podría ver como que tiene cinco porciones: «espaciador A» entre la superficie y un primer resto conector, el primer resto conector, «espaciador B» entre el primer resto conector y un segundo resto conector, el segundo resto conector, y el «espaciador C» entre el segundo resto conector y el resto de heparina. En una realización, la masa molecular del espaciador A está entre 50 y 10^3 Da. En una realización, la masa molecular del espaciador B está entre 100 y 10^6 Da. En una realización, la masa molecular del espaciador C está entre 50 y 10^3 Da. En una realización, el espaciador A y/o el espaciador B y/o el espaciador C es hidrófilo, por ejemplo, al comprender una cadena de PEG. Por ejemplo, el espaciador B (al menos) podría comprender una cadena de PEG.

Aunque los espaciadores podrían estar presentes, típicamente no son necesarios ya que se debe observar que la estructura de los polímeros hiperramificados, en virtud de su tamaño y forma, proporciona cierta separación entre el resto de heparina y la superficie del dispositivo.

En los casos en donde los espaciadores están presentes, se trata, por ejemplo, de espaciadores de cadena lineal de aproximadamente 10 a 10^3 Å.

Un mérito específico de tener un espaciador que comprende una cadena de PEG (u otro polímero hidrófilo) es que da a conocer el dispositivo con propiedades lubricantes.

El espaciador puede ser biodegradable o no biodegradable, pero es más idóneamente no biodegradable para que un dispositivo revestido no sea trombogénico durante un largo periodo de tiempo (a saber, el dispositivo revestido mantenga las propiedades no trombogénicas).

Funcionalización de los elementos fundamentales del revestimiento

i. Formación de conectores en la que no se necesita la modificación previa de la molécula del polímero hiperramificado ni del resto de heparina

Varios de los conectores mostrados más arriba en la tabla 3 se pueden formar directamente al hacer reaccionar un grupo funcional terminal de un polímero hiperramificado, por ejemplo, una poliamina hiperramificada, con un resto de heparina que contiene un aldehído.

Así pues, la aminación reductiva, la adición de Michael, la reacción de SPDP y las reacciones de amidación que se muestran en la tabla 3 necesitan la presencia de un grupo funcional de amina primaria en el extremo. Las moléculas hiperramificadas, tales como las poliaminas hiperramificadas, p. ej., dendrímeros de PAMAM, poseen grupos de amina primaria libres idóneos para ser usados en estas reacciones de formación de enlaces y, por lo tanto, no necesitan más modificaciones.

Por lo tanto, en una realización, la molécula del polímero hiperramificado lleva varios grupos de amina primaria libres como grupos funcionales terminales y es, por ejemplo, una molécula de polímero hiperramificado de PPI o de PEI.

La heparina degradada con ácido nitroso y la heparina nativa llevan grupos reactivos, un grupo aldehído y una función hemiacetal, respectivamente, en su extremo reductor, y, así pues, la heparina degradada con ácido nitroso o la heparina nativa se pueden hacer reaccionar con un polímero hiperramificado que tiene grupos de amina primaria libres en una reacción de aminación reductiva para formar un conector que contiene un grupo de amina secundaria tal y como se muestra en la tabla 3 y en el esquema 4 más arriba.

Los métodos para formar un enlace de amina secundaria entre una superficie funcionalizada con amina y un derivado de heparina se describen, por ejemplo, en las patentes europeas EP-B-0086186, EP-B-0086187, EP-B-0495820 y en la patente de los Estados Unidos US 6.461.665.

ii. Formación del enlace cuando se necesita la modificación del polímero hiperramificado y/o del resto de heparina

Como alternativa, cualquiera del resto de heparina y del polímero hiperramificado, o ambos, se podrían modificar para llevar un grupo funcional idóneo, tal y como se explicará con mayor detalle más adelante.

Los métodos para modificar la heparina y otros restos de heparina, p. ej., para incorporarle grupos alquino y azida, se describen en la solicitud de patente internacional WO2010/029189.

Así pues, para algunos de los conectores descritos más arriba en la tabla 3, es necesario preparar con anterioridad los derivados funcionalizados de cualquiera de la molécula de polímero hiperramificado y del resto de heparina, o de ambos.

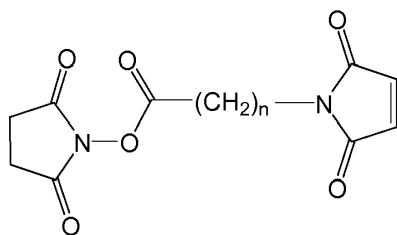
La molécula del polímero hiperramificado se podría funcionalizar mediante el uso de las técnicas conocidas en la técnica. Los grupos amino primarios en un polímero hiperramificado se podrían utilizar como puntos de unión para un grupo funcional idóneo para la formación del enlace covalente elegido, por ejemplo, un grupo alqueno, alquino, tiol, halo o azido. Así pues, las poliaminas hiperramificadas se podrían funcionalizar para llevar grupos alqueno, alquino, tiol, halo o azido por medios convencionales, p. ej., al hacer reaccionar los grupos de amina primaria colgantes en la poliamina con un ácido carboxílico activado (p. ej., una modificación de un ácido carboxílico con *N*-hidroxisuccinimida) que contiene un grupo alqueno, alquino, tiol, halo o azido.

Así pues, para introducir los grupos alqueno o alquino idóneos, una molécula de poliamina hiperramificada que lleva numerosos grupos de amina primaria se representa de la siguiente manera:

$R''\text{-NH}_2$

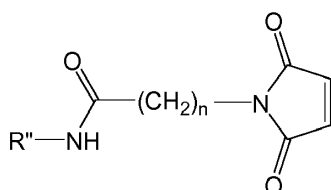
en donde R'' es el resto de poliamina hiperramificada;

se podría hacer reaccionar con un compuesto de la fórmula:



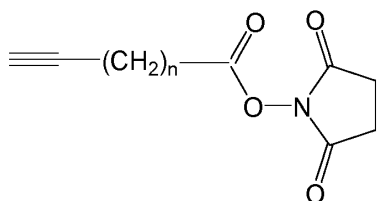
en donde n es un entero de 1 a 8, p. ej., de 1 a 4;

para dar una poliamina funcionalizada con maleimida de la fórmula:



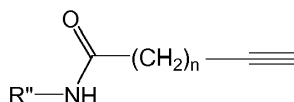
en donde R'' y n son tal y como está definido más arriba.

Como alternativa, la poliamina hiperramificada se podría hacer reaccionar con un grupo que contiene alquino activado de la fórmula:



en donde n es un entero de 1 a 8, p. ej., de 1 a 4;

para dar una poliamina hiperramificada funcionalizada con alquino de la fórmula:



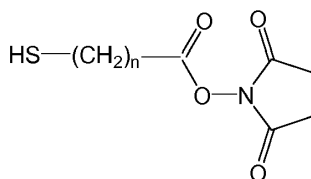
5 en donde R'' y n son según está definido más arriba.

De igual forma, un polímero hiperramificado que tiene aminas primarias libres como grupos funcionales terminales se podría modificar con un grupo tiol. En este caso, una poliamina hiperramificada que lleva numerosos grupos de amina primaria se representa de la manera siguiente:



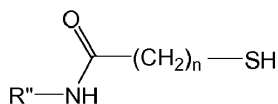
10 en donde R'' es tal y como está definido más arriba;

se podría hacer reaccionar con un ácido carboxílico activado que contiene tiol, por ejemplo, un compuesto de la fórmula:



en donde n es un entero de 1 a 8, p. ej., de 1 a 4;

15 para dar un polímero modificado de la fórmula:



en donde R'' y n son tal y como está definido más arriba.

Se podrían introducir grupos halo en la molécula del polímero hiperramificado de una manera parecida.

20 También se puede considerar la utilización de otras reacciones de amidación que implican SPDP o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) para obtener la misma funcionalización.

Un resto de heparina que lleva un alqueno, aldehído, alquino, tiol, azo, amina, haluro, ácido carboxílico activado, éster de maleimida o un grupo carbonilo α,β -insaturado se podría fabricar mediante los métodos convencionales conocidos por sí mismos. Por ejemplo, un resto de heparina, que lleva un grupo alquino/alqueno, se podría fabricar mediante la reacción de una alcoxiamina de la fórmula:

25
$$\text{R}^1\text{—O—NH}_2$$

en donde R¹ es un grupo que contiene alquino/alqueno; con un grupo aldehído o hemiacetal sobre el resto de heparina mediante el uso de técnicas convencionales conocidas por sí mismas, véanse, p. ej., los ejemplos 3a, 3b y 3c de la solicitud de patente internacional WO 2010/029189. Este tipo de reacción continúa a través de la formación de una función oxi-imina para dar un compuesto de la fórmula:

30
$$\text{R}^1\text{—O—N=R'}$$

en donde R¹ es tal y como está definido más arriba y R' es el grupo del resto de heparina.

La heparina degradada con ácido nitroso y la heparina nativa llevan grupos reactivos, un grupo aldehído y una función hemiacetal, respectivamente, en su extremo reductor que podría estar unido de esta manera.

De igual forma, un resto de heparina modificado con un grupo tiol se podría formar mediante la reacción de un grupo aldehído o un grupo hemiacetal sobre el resto de heparina con un compuesto de la fórmula:

5 HS-X-NH₂

en donde X es un hidrocarburo espaciador, por ejemplo (CH₂)_n en donde n es de 1 a 8, p. ej., de 1 a 4, en la que uno o más (p. ej., 1 o 2) grupos metileno están optativamente remplazados por O; o X comprende una cadena de PEG que contiene de 1 a 100 (p. ej., de 1 a 50, tal como de 1 a 10) unidades de etilenglicol;

para dar un producto de la fórmula

10 R'-CH₂-NH-X-SH

en donde X es tal y como está definido más arriba y R'-CH₂- es el grupo del resto de heparina.

Un ejemplo de tal procedimiento se ofrece en el ejemplo 4.2 que viene a continuación.

Se puede emplear un método parecido para introducir un grupo azido o un grupo halo, tal como fluoro, cloro o bromo.

15 Tal y como se explica más arriba, una razón para modificar el polímero hiperramificado es la introducción de determinados grupos funcionales para permitir el acoplamiento al resto de heparina. Cuando el polímero hiperramificado tiene determinados grupos funcionales terminales existentes, p. ej., grupos de amina primaria, estos se pueden convertir en otros grupos funcionales, por ejemplo, grupos azida o alquino. Todos o (más habitualmente) algunos (p. ej., del 0,5 al 25%) de los grupos funcionales se podrían convertir para este propósito.

20 También se puede desear la introducción de nuevos grupos funcionales con otros propósitos. Por ejemplo, algunos (p. ej., del 0,5 al 25%) de los grupos funcionales terminales existentes (p. ej., grupos de amina primaria) se podrían convertir en otros grupos funcionales, por ejemplo, grupos azida o alquino para permitir la unión de agentes beneficiosos, p. ej., los lubricantes mencionados más adelante.

Revestimiento de la superficie

25 El dispositivo tiene una superficie que comprende un revestimiento de capas formado por una o más capas. El dispositivo, en particular cuando es un producto sanitario, podría tener una o más porciones que contienen espacios vacíos, o poros. Los poros podrían estar dentro del dispositivo y/o ser parte de al menos una superficie del dispositivo. Un ejemplo de un producto sanitario poroso es el politetrafluoroetileno expandido (PTFEe). Los poros podrían tener una capa de revestimiento o no.

30 Sería deseable que una porción de la superficie (lo deseable es que no sea trombogénica) o toda la superficie del dispositivo esté cubierta con un revestimiento.

La superficie de un dispositivo podría tener una o muchas capas de revestimiento (p. ej., 2 o más, o 3 o 4 o 5, p. ej., hasta 20 capas de revestimiento) y la terminología «capa externa del revestimiento» se refiere a una capa del revestimiento que, en un producto sanitario, está en contacto con los tejidos del paciente o está en contacto con los líquidos corporales, o en un dispositivo analítico o de separación, entra en contacto con una sustancia a analizar, a separar o a manipular. Así pues, la capa externa del revestimiento podría ser la capa del revestimiento en la superficie externa y/o interna de un dispositivo hueco o de un dispositivo de estructura abierta, tal como un muelle endovascular. Una capa que no es la capa externa del revestimiento se denomina en la presente memoria una «capa interna».

40 De acuerdo con la invención, la capa externa del revestimiento comprende numerosas moléculas del polímero hiperramificado catiónico a las cuales se unen covalentemente uno o más restos de heparina a través de grupos funcionales terminales.

En general, la mayoría, o incluso todas, las moléculas del polímero hiperramificado catiónico de la capa externa del revestimiento tendrán numerosos restos de heparina unidos covalentemente a ellas a través de sus grupos funcionales terminales.

45 El número óptimo de capas dependerá del tipo de material del cual está hecho el dispositivo y del uso contemplado del revestimiento de la superficie. El número y la naturaleza de las capas necesarias para proporcionar una cobertura total de la superficie del dispositivo lo pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica. El revestimiento de la superficie podría, si se desea, fabricarse capa a capa.

50 Por ejemplo, la una o más capas de revestimiento se podrían formar por la adsorción de un polímero catiónico en la superficie del dispositivo, seguido de la aplicación de una solución de un polímero aniónico, p. ej., un polisacárido

aniónico, p. ej., sulfato de dextrano o un polímero hiperramificado catiónico funcionalizado con una carga neta negativa, para obtener al menos una capa adsorbida del polímero aniónico. Véase *Multilayer Thin Films* ISBN: 978-3-527-30440-0. Así pues, la superficie podría comprender una capa de polímero catiónico y una capa de polímero aniónico, p. ej., un polisacárido o un polímero hiperramificado catiónico funcionalizado con una carga neta negativa.

5 Más en general, el revestimiento de la superficie podría comprender una o varias bicapas de revestimiento de polímero catiónico y polímero aniónico.

Típicamente la capa más interna (a saber, la capa aplicada en la superficie desnuda del dispositivo, por ejemplo, una superficie de metal, plástico o cerámica) es una capa de polímero catiónico.

10 Tal y como se explica con más detalle más adelante, la capa externa del revestimiento, que comprende numerosas moléculas del polímero hiperramificado catiónico a las cuales se unen covalentemente uno o más restos de heparina a través de sus grupos funcionales terminales, se podría aplicar de uno de los dos modos. Según el primer modo, las moléculas del polímero hiperramificado catiónico con una carga positiva general se podrían aplicar a un polímero aniónico sobre la superficie del dispositivo. Las moléculas del polímero hiperramificado se modifican a continuación para conectarlas a los restos de heparina. Según el segundo modo, las moléculas del polímero hiperramificado

15 catiónico a las cuales se unen covalentemente uno o varios restos de heparina a través de sus grupos funcionales terminales se podrían aplicar a un polímero aniónico o catiónico sobre la superficie del dispositivo según si las moléculas del polímero hiperramificado funcionalizado llevan una carga global positiva o negativa.

En algunos casos, las moléculas del polímero hiperramificado catiónico podrían estar interconectadas con el revestimiento polimérico de la superficie a través de grupos funcionales reactivos. Si el polímero hiperramificado

20 catiónico está interconectado con la superficie del dispositivo o con las capas de revestimiento internas antes de la reacción con el resto de heparina, es necesario asegurarse de que un número suficiente de grupos amino (u otros grupos reactivos introducidos) permanecen disponibles para mantener la capacidad de conectarse a la cantidad deseada de restos de heparina en la capa externa del revestimiento. Como alternativa, las moléculas del polímero hiperramificado catiónico se pueden hacer reaccionar con los restos de heparina antes de la aplicación a la

25 superficie del dispositivo o a una capa de revestimiento y a continuación interconectarlas. Típicamente, no hay interconexión directa entre el resto de heparina y el revestimiento de la superficie.

Se podría usar una gama de polímeros catiónicos para las capas internas. Un polímero catiónico de ejemplo es una poliamina (p. ej., que se describe en la patente europea EP 0086187 de Larsson y Gölander). Tales polímeros podrían ser una cadena lineal, pero es más habitual que sea un polímero de cadena ramificada o, como alternativa,

30 un polímero hiperramificado, optativamente interconectado. Como alternativa, una o más (p. ej., todas) las capas de polímero catiónico diferentes de la capa externa del revestimiento podrían comprender (p. ej., estar formadas por) moléculas del polímero hiperramificado catiónico, que son iguales o parecidas a las utilizadas en la capa externa del revestimiento. Optativamente, también se podrían estar interconectadas.

El procedimiento de revestimiento se podría realizar esencialmente tal y como se describe en la patente europea EP-B-0495820 y en este caso es solo la capa externa del revestimiento la que comprende el resto de heparina.

35

El procedimiento de la patente europea EP-B-0495820 se podría, sin embargo, modificar para que la capa externa sea el polímero aniónico que a continuación se acopla, tal y como se describe más abajo, a un polímero hiperramificado catiónico al cual esta unido uno o más restos de heparina (pero que todavía conserva una carga neta positiva) o se acopla con un polímero hiperramificado catiónico con el grupo o grupos funcionales terminales

40 capaces de reaccionar con grupos funcionales en un resto de heparina para formar un resto de conector covalente tal y como está descrito más arriba.

De acuerdo con una realización, se da a conocer un dispositivo en donde una o varias capas del revestimiento de capas que no es la capa externa del revestimiento comprende moléculas del polímero hiperramificado catiónico caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de

45 1.500 a 1.000.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 (p. ej., al menos 100:1), y (iv) grupos funcionales terminales que están optativamente modificados, p. ej., con una o varias entidades anticoagulantes.

De acuerdo con una realización de la invención cuando las capas internas comprenden polímeros catiónicos, podrían comprender moléculas del polímero hiperramificado catiónicos caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 1.500 a 1.000.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 (p. ej., al menos 100:1), y (iv) grupos funcionales terminales. De acuerdo con esta realización, estas moléculas del polímero hiperramificado catiónico podrían ser las mismas que las utilizadas en la capa externa del revestimiento (pero sin llevar fijado el resto de heparina) o podrían ser moléculas de polímeros hiperramificados diferentes. En cualquier caso, las moléculas de

50 polímeros hiperramificados catiónicos incluyen las descritas en otro lugar de la presente memoria con respecto a las moléculas del polímero hiperramificado catiónico que se podrían utilizar para preparar la capa externa del revestimiento.

55

Por ejemplo, todas las capas internas que comprenden polímeros catiónicos podrían comprender moléculas del polímero hiperramificado catiónico caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 1.500 a 1.000.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 (p. ej., al menos 100:1); y (iv) grupos funcionales terminales.

- 5 El polímero aniónico también podría ser un polímero hiperramificado catiónico funcionalizado con una carga neta negativa.

De acuerdo con una realización, cuando las capas internas comprenden polímeros aniónicos, podrían comprender moléculas del polímero hiperramificado catiónico caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 1.500 a 1.000.000 Da, (iii), una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 (p. ej., al menos 100:1), y (iv) grupos funcionales terminales, gracias a lo cual uno o varios de dichos grupos funcionales terminales tienen una entidad anticoagulante aniónica unida covalentemente a ellos, lo que otorga a las moléculas una carga neta negativa.

Por ejemplo, todas las capas internas que comprenden polímeros aniónicos podrían comprender moléculas del polímero hiperramificado catiónico caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 1.500 a 1.000.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 (p. ej., al menos 100:1), y (iv) grupos funcionales terminales, gracias a lo cual uno o varios de dichos grupos funcionales terminales tienen una entidad anticoagulante aniónica unida covalentemente a ellos, lo que otorga a las moléculas una carga neta negativa.

De acuerdo con una realización, las capas del revestimiento sobre la superficie del dispositivo son todas bien (a) moléculas del polímero hiperramificado catiónico caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 1.500 a 1.000.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 (p. ej., al menos 100:1), y (iv) grupos funcionales terminales, o (b) moléculas del polímero hiperramificado catiónico caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 1.500 a 1.000.000 Da, y (iii) una razón de la masa molecular total por la masa molecular del resto central de al menos 80:1 (p. ej., al menos 100:1), y (iv) grupos funcionales terminales, gracias a lo cual uno o varios de dichos grupos funcionales terminales tienen una entidad anticoagulante aniónica unida covalentemente a ellos, lo que otorga a las moléculas una carga neta negativa.

Una ventaja de esto es que se disminuye al mínimo el número de componentes diferentes de las capas del revestimiento.

Antes de aplicar la primera capa de revestimiento (a saber, la capa más interna), la superficie del dispositivo se podría limpiar para mejorar la adherencia y la cobertura de la superficie. Los agentes de limpieza idóneos incluyen solventes tales como etanol o isopropanol (AIP), soluciones de pH alto, como las soluciones que comprenden una mezcla de un alcohol y una solución acuosa de un compuesto hidróxido (p. ej., hidróxido de sodio), una solución de hidróxido de sodio tal cual, soluciones que contienen hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), Piranha básica (amoníaco y peróxido de hidrógeno), Piranha ácida (una mezcla de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno), y otros oxidantes, entre ellos combinaciones de ácido sulfúrico y permanganato de potasio o diferentes tipos de ácido peroxisulfúrico o soluciones de ácido peroxidisulfúrico (también como sales de amonio, sodio y potasio).

Así pues, un aspecto de la invención es un dispositivo que tiene un revestimiento de la superficie en donde el revestimiento de la superficie comprende una o más bicapas de revestimiento de polímero catiónico y polímero aniónico, en donde la capa externa del revestimiento de revestimiento comprende numerosas moléculas del polímero hiperramificado catiónico caracterizadas por tener (i) un resto central con una masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 10.000 a 300.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1, y (iv) grupos funcionales terminales, gracias a lo cual uno o varios de dichos grupos funcionales terminales tienen un resto de heparina fijado covalentemente por un solo punto de estos, en donde dicho resto de heparina tiene un solo punto covalentemente fijado a la molécula del polímero hiperramificado a través del extremo reductor del resto de heparina, y en donde el polímero hiperramificado no es un dendrímero.

Formación de la capa externa del revestimiento

Tal y como se describió brevemente más arriba, la entidad del resto de heparina podría fijarse a las moléculas del polímero hiperramificado antes o bien después de que las moléculas del polímero hiperramificado se apliquen a la superficie del dispositivo. La superficie del dispositivo al cual se aplica la capa externa del revestimiento podría contener optativamente una o más capas internas. Véase la figura 7.

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención se da a conocer un procedimiento para fabricar un dispositivo tal y como está descrito más arriba, en donde el procedimiento comprende, en cualquier orden:

- 55 i. hacer reaccionar numerosos grupos funcionales terminales de moléculas del polímero hiperramificado con restos de heparina de tal manera que cada molécula del polímero hiperramificado está covalentemente conectado a numerosos restos de heparina; y

ii. unir las moléculas del polímero hiperramificado a la superficie de un dispositivo.

Tal y como está descrito más arriba, los restos de heparina están unidos a una molécula del polímero hiperramificado a través de un enlace covalente y podría, en algunos casos, ser necesario realizar una etapa adicional de modificación de las moléculas del polímero hiperramificado y/o del resto de heparina antes de la etapa (i) para introducir grupos funcionales idóneos para formar un enlace covalente entre las moléculas del polímero hiperramificado y el resto de heparina.

La idoneidad de los enlaces covalentes y los métodos con los que modificar el polímero hiperramificado y/o el resto de heparina se explican con más detalle más arriba. Tal y como se observó más arriba, el conector podría estar separado optativamente de la superficie y/o del resto de heparina mediante un espaciador. Así pues, el procedimiento podría implicar optativamente la modificación de la superficie y/o del resto de heparina mediante el aporte de un espaciador.

Cuando la primera etapa del procedimiento de más arriba es la etapa (i), el procedimiento de unir los restos de heparina a las moléculas del polímero hiperramificado se podría llevar a cabo en una solución en las condiciones de reacción apropiadas con los solventes idóneos que son, por ejemplo, THF, DCM, DMF, DMSO, AIP, metanol, etanol y agua, incluidas las mezclas de los mismos.

Cuando la segunda etapa del procedimiento es la etapa (i) (a saber, la primera etapa del procedimiento es la etapa (ii)), la capa externa del revestimiento del dispositivo se pondrá normalmente en contacto con una solución del resto de heparina en las condiciones de reacción adecuadas. Los solventes idóneos para el resto de heparina son, por ejemplo, AIP, etanol, THF, DMF, DMSO, DCM y en particular agua, incluidas las mezclas de los mismos.

En una realización, tal y como se mencionó ya, se podrían agregar por interconexión dos o más moléculas del polímero hiperramificado.

Por lo tanto, el procedimiento de más arriba podría además comprender la etapa adicional de interconectar dos o más moléculas del polímero hiperramificado entre sí. Las dos o más moléculas del polímero hiperramificado se podrían agregar por interconexión antes o después de que las moléculas del polímero hiperramificado se funcionalicen con uno o más restos de heparina. El orden en el cual se realiza la interconexión podría depender del dispositivo, p. ej., la geometría del dispositivo. Preferiblemente la interconexión se realiza después de la funcionalización. Además, la etapa de interconexión podría tener lugar antes o bien después de la unión de las moléculas del polímero hiperramificado a la superficie del dispositivo.

El procedimiento podría incluir también la etapa de interconexión de una o más moléculas del polímero hiperramificado a la superficie del dispositivo. Por ejemplo, las moléculas del polímero hiperramificado a las cuales se unen uno o más restos de heparina sobre la capa externa del revestimiento también podrían estar interconectadas a un polímero catiónico o aniónico de la capa inferior de la otra capa de revestimiento.

Esta etapa de interconexión podría ser parte de la etapa (ii) de más arriba o, como alternativa, la etapa de interconexión se podría realizar después de la etapa (ii) para reforzar la adherencia de las moléculas del polímero hiperramificado a la superficie del dispositivo y mejorar la estabilidad del revestimiento.

Si cualquier interconexión necesaria, bien entre dos o más moléculas del polímero hiperramificado o entre las moléculas del polímero hiperramificado y la superficie, se lleva a cabo antes de la modificación, es necesario asegurarse de que permanecen suficientes grupos funcionales libres en la molécula hiperramificada para permitir la unión de un número idóneo de restos de heparina. Como alternativa, si la modificación se realiza primero, entonces el grado de modificación debe ser de tal manera que los grupos funcionales libres permanezcan para cualquier interconexión que sea necesaria.

En general, se prefiere que la etapa (i) se realice antes que la etapa (ii) ya que es más fácil controlar la cantidad de restos de heparina que se fijan a las moléculas del polímero hiperramificado y, además, se disminuye al mínimo el despilfarro de restos de heparina, en particular cuando la reacción se realiza en solución, tal y como está descrito más arriba.

Se da a conocer como un aspecto de la invención un dispositivo que se puede obtener mediante los procedimientos mencionados más arriba.

Se describe un dispositivo no trombogénico que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:

(a) tratar un dispositivo para que presente un revestimiento de superficie que comprenda una capa externa del revestimiento que comprenda moléculas del polímero hiperramificado catiónico caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 1.500 a 1.000.000 Da y que llevan grupos funcionales terminales, y (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 (p. ej., al menos 100:1);

(b) hacer reaccionar uno o varios de dichos grupos funcionales terminales con moléculas de una entidad anticoagulante que está funcionalizada para llevar grupos que son capaces de reaccionar con los grupos funcionales reactivos del polímero catiónico hiperramificado;

de tal modo que se une la entidad anticoagulante al polímero catiónico hiperramificado.

5 Otro aspecto de la invención es un dispositivo no trombogénico que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:

(a) tratar un dispositivo para que presente una capa superficial de polímero cargado positivamente;

(b) asociar a dicha capa superficial de polímero, moléculas del polímero hiperramificado catiónico funcionalizado caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 10.000 a 300.000 Da, y (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 y que lleva numerosos restos de heparina cargados negativamente y en donde dicho polímero catiónico hiperramificado funcionalizado tiene una carga neta negativa y no es un dendrímero.

en donde dichos restos de heparina están unidos covalentemente por un solo punto al polímero hiperramificado a través del extremo reductor del resto de heparina.

15 Otro aspecto de la invención es un dispositivo no trombogénico que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:

(a) tratar un dispositivo para que presente una capa superficial de polímero cargado negativamente;

(b) asociar a dicha capa superficial de polímeros, moléculas del polímero hiperramificado catiónico funcionalizado caracterizadas por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 10.000 a 300.000 Da, y (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1 y que lleva uno o más restos de heparina cargados negativamente y en donde dicho polímero hiperramificado funcionalizado tiene una carga neta positiva y no es un dendrímero,

en donde dichos restos de heparina están unidos covalentemente por un solo punto al polímero hiperramificado a través del extremo reductor del resto de heparina.

25 Por ejemplo, se trata el dispositivo para que presente una superficie que comprende un polímero aniónico, por ejemplo, un polisacárido tal como sulfato de dextrano, derivados del mismo, o un polímero hiperramificado catiónico funcionalizado con una carga neta negativa.

Interconexión

30 Tal y como se describe en la presente memoria, las moléculas del polímero hiperramificado de la capa externa del revestimiento podrían estar interconectadas optativamente a otras moléculas del polímero hiperramificado de la capa externa del revestimiento o podrían estar interconectadas a moléculas (p. ej., moléculas de polímero hiperramificado) de una capa interna. Las moléculas de polímeros en las capas internas podrían estar interconectadas optativamente.

35 Los agentes de interconexión idóneos que se podrían utilizar con estos propósitos se elegirán de acuerdo con la química de acoplamiento requerida. Podría, en principio, utilizarse cualquier interconector di-, tri- o multifuncional, tal como los PEG y Jeffaminas funcionalizados. Para interconectar las aminas, sería idóneo utilizar los aldehídos difuncionales, tales como crotonaldehído o glutaraldehído. En algunos casos, podría ser útil la epíclorohidrina.

40 La interconexión es capaz de crear un enlace covalente entre un grupo funcional terminal de la molécula del polímero hiperramificado de la capa externa del revestimiento y un grupo funcional terminal de otra molécula del polímero hiperramificado de la capa externa del revestimiento o una molécula (p. ej., una molécula de polímero hiperramificado o una molécula de polímero catiónico o aniónico) de una capa interna. Tal interconexión no incluye idóneamente el resto de heparina. Así pues, idóneamente, el resto de heparina tiene una conexión covalente solo con una molécula del polímero hiperramificado y no con cualquier otra molécula. Idóneamente, la interconexión de una molécula del polímero hiperramificado con otra molécula del polímero hiperramificado implica el uso de grupos funcionales terminales sobre la molécula del polímero hiperramificado que no están implicados en el enlace al resto de heparina. En una realización, dichos grupos funcionales utilizados en la interconexión se forman mediante la refuncionalización de los grupos funcionales terminales originales de la molécula del polímero hiperramificado.

Dispositivos

50 El dispositivo podría ser cualquier dispositivo al cual es deseable unir restos de heparina, por ejemplo, un producto sanitario, un dispositivo analítico o un dispositivo de separación.

Para los propósitos de la solicitud de esta patente, la terminología «producto sanitario» hace referencia a cualquier dispositivo implantable o no implantable, pero lo más habitual son los productos sanitarios implantables. Los

- ejemplos de productos sanitarios implantables que podrían ser productos sanitarios implantables permanentes o temporales incluyen catéteres, muelles endovasculares, entre ellos los muelles endovasculares con bifurcación, muelles endovasculares expandibles con globo, muelles endovasculares autexpandibles, endoprótesis cubiertas que incluyen endoprótesis cubiertas con bifurcación, injertos que incluyen injertos vasculares, injertos con bifurcación, vasos sanguíneos artificiales, dispositivos de monitorización de la sangre permanentes, válvulas cardíacas artificiales, electrodos de marcapasos, alambres de guía, electrodos cardíacos, circuitos de derivación cardiopulmonar, cánulas, conectores, dispositivos de administración de fármacos, globos, dispositivos con parches de tejido y bombas sanguíneas. Ejemplos de productos sanitarios no implantables son los dispositivos extracorporales, p. ej., dispositivos de tratamiento de la sangre extracorporal y dispositivos de transfusión.
- Los dispositivos podrían tener una aplicación neurológica, periférica, cardíaca, ortopédica, dérmica y ginecológica, entre otras cosas.
- Un producto sanitario podría tener una o más capas de revestimiento y la terminología «capa externa del revestimiento» se refiere a una capa de revestimiento que, cuando se implanta el dispositivo en un paciente o está en uso, está en contacto con los tejidos del paciente o está en contacto con los líquidos corporales, p. ej., la sangre. Así pues, la capa externa del revestimiento podría ser la capa de revestimiento sobre la superficie externa y/o la superficie interna de un dispositivo hueco o un dispositivo de estructura abierta, tal como un muelle endovascular.
- Un dispositivo analítico podría ser, por ejemplo, un soporte sólido para realizar un procedimiento analítico, tal como una cromatografía o un ensayo inmunitario, reacción química o catálisis. Ejemplos de tales dispositivos incluyen portaobjetos, perlas, placas con pocillos, membranas, etc. Un dispositivo de separación podría ser, por ejemplo, un soporte sólido para llevar a cabo un procedimiento de separación, tal como purificación de proteínas, cromatografía de afinidad o de intercambio iónico. Ejemplos de tales dispositivos incluyen filtros y columnas, etc. Al igual que un producto sanitario, un dispositivo analítico o un dispositivo de separación podría tener también muchas capas de revestimiento y la terminología «capa externa del revestimiento» se refiere a una capa de revestimiento que entra en contacto con una sustancia a ser analizada, separada o manipulada.
- En algunos casos, podría ser deseable ajustar las propiedades del revestimiento y, en este caso, una o varias entidades más se podrían fijar al polímero hiperramificado además del resto de heparina. Por ejemplo, si se desea incrementar la hidrofilia del polímero hiperramificado, las entidades adicionales podrían comprender una o varias cadenas de PEG.
- Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «cadena de PEG» se refiere a una cadena polimérica que se puede obtener mediante la polimerización del óxido de etileno, típicamente con una masa entre 10^2 y 10^6 Da.
- El revestimiento del dispositivo podría comprender capas alternas de un polímero catiónico y un polímero aniónico. El polímero catiónico podría ser un polímero de cadena lineal, pero es más habitualmente un polímero de cadena ramificada, un polímero hiperramificado o un polímero que comprende numerosas moléculas del polímero hiperramificado (catiónico), en donde, en la capa externa del revestimiento, hay unido covalentemente a dichas moléculas del polímero hiperramificado uno o varios restos de heparina a través de sus grupos funcionales terminales.
- Así pues, en una realización de la invención, una o más capas del revestimiento, diferente de la capa externa, se podrían formar a partir de las mismas o similares moléculas de polímero hiperramificado que la capa externa. Las peculiaridades de tales subcapas podrían ser como las descritas para la capa externa, véanse los ejemplos 2.2 y 3.3.
- El dispositivo podría comprender o estar formado por un metal o un polímero orgánico o inorgánico que se produce de forma natural o sintético, o un material cerámico, entre otras cosas.
- Así pues, por ejemplo, podría estar formado por un polímero o material orgánico o inorgánico que se produce de forma natural o sintético, tal como polietileno, polipropileno, poliacrilato, policarbonato, polisacárido, poliamida, poliuretano (PU), polivinilcloruro (PVC), polieterecetona (PEEK), celulosa, silicona o goma (polisopreno), materiales plásticos, metales, vidrio, cerámica y otro material médico conocido o una combinación de tales materiales. Otros materiales de sustrato idóneos incluyen fluoropolímeros, p. ej., politetrafluoroetileno expandido (PTFEe), politetrafluoroetileno (PTFE), etilenpropileno fluorado (EPF), copolímeros de perfluorocarbono, p. ej., copolímeros de tetrafluoroetileno y éter de perfluoroalquivinilo (TFE/EPFV), copolímeros de tetrafluoroetileno (TFE) y éter de perfluorometilo y vinilo (PMVE), y combinaciones de los anteriores con o sin interconexión entre las cadenas de polímeros.
- Los metales idóneos incluyen aleación de titanio y níquel (Nitinol), acero inoxidable, titanio, cobalto, cromo, oro y platino. Se prefieren el Nitinol y el acero inoxidable. También se prefiere el titanio.
- Más en general, los metales idóneos incluyen materiales y aleaciones metálicos, tales como aleación de cobalto y cromo (ELGILOY), acero inoxidable (316L), acero inoxidable con mucho nitrógeno, aleación de cobalto y cromo L-605, MP35N, MP20N, tantalio, aleación de níquel y titanio, Nitinol, aleación de platino e iridio, oro, magnesio y combinaciones de los mismos.

Se prefiere que la superficie revestida a la cual se fija el resto de heparina sea de tal manera que conserve sus propiedades no trombogénicas después de la esterilización, p. ej., esterilización con óxido de etileno (OE).

La esterilización se podría llevar a cabo mediante los medios que conocen bien los expertos en la técnica. El método preferido de esterilización es mediante el uso de óxido de etileno gaseoso. Como alternativa, otros métodos tales como la radiación, p. ej., haces de electrones o radiación γ , podrían utilizarse cuando tal radiación no degrade el objeto ni el revestimiento ni ninguno de los dos.

Una realización preferida de la presente invención se hace referencia a un producto sanitario revestido para implantación, p. ej., implantación permanente, u otra colocación, en un sitio anatómico. Otras realizaciones preferidas incluyen dispositivos de uso temporal, tales como catéteres y circuitos extracorporales. Ejemplos son productos sanitarios estériles (p. ej., esterilizados) para la colocación dentro de una estructura anatómica que delimita un espacio vacío, o luz, para reforzar la estructura anatómica o mantener el espacio vacío. Idóneamente, el resto de heparina fijado no se eluye en ninguna cantidad sustancial y permanece con el dispositivo. Por ejemplo, al cabo de un enjuague de 15 horas con NaCl (0,15 M) antes de la prueba, la capacidad de fijación de AT conservada permanece adecuada (p. ej., mayor que 1 o 2 o 4 o 5 o 10 pmol/cm²) y/o cuando se analiza en la prueba de evaluación en asa de sangre (véase el ejemplo 6) con sangre de nueva aportación de un donante sano, la reducción del número de trombocitos de la sangre después de la prueba es sustancialmente más bajo para la sangre expuesta a la superficie revestida de acuerdo con la invención que la de un control sin revestir (p. ej., la reducción del número de trombocitos después de la prueba para la sangre expuesta a la superficie revestida es de menos del 20%, preferiblemente menos del 15% y más preferiblemente menos del 10%).

El carácter no trombogénico de los dispositivos de acuerdo con la presente invención se podría analizar mediante numerosos métodos. Por ejemplo, el carácter no trombogénico podría estar asociado con tener una alta capacidad de fijación de antitrombina, en particular cuando se compara con dispositivos que tienen las superficies sin tratar.

Por ejemplo, nosotros preferimos que la superficie del dispositivo, p. ej., el producto sanitario, tenga una capacidad de fijación de antitrombina (AT) de al menos 1 (p. ej., al menos 5) picomoles de AT por centímetro cuadrado (pmol/cm²) de superficie. En otras realizaciones, la capacidad de fijación de AT es de al menos 6 pmol/cm², al menos 7 pmol/cm², al menos 8 pmol/cm², al menos 9 pmol/cm², o al menos 10 pmol/cm² de superficie. En algunas realizaciones, la capacidad de fijación de AT es de al menos 100 pmol/cm² de superficie. La capacidad de fijación de AT se puede medir mediante los métodos conocidos en la técnica, p. ej., los descritos en Pasche et al., en «Binding of antithrombin to immobilized heparin under varying flow conditions» *Artif. Organs* 15: 481-491 (1991) y la patente de los EE. UU. US 2007/0264308. A modo de comparación, se podría concluir a partir de Sanchez et al (1997) *J. Biomed. Mater. Res.* 37 (1), 37-42, véase la figura 1, que los valores de fijación de AT de aproximadamente 2,7 a 4,8 pmol/cm² (según el ajuste experimental) o más no parecen dar lugar a ningún incremento significativo de la actividad enzimática trombogénica tras entrar en contacto con el plasma.

Como alternativa, o además, preferimos que la superficie no sea trombogénica debido a la alta capacidad para suprimir la coagulación y otros sistemas de defensa, tal y como se muestra en la prueba de evaluación en asa de sangre descrita en el ejemplo 6. Según esta prueba, la superficie a estudiar se aplica a un tubo de PVC que se enjuaga durante 15 horas con NaCl a 0,15 M antes del análisis con sangre de nueva aportación.

La trombogenia de una superficie de control sin revestir se indica mediante una reducción del número de trombocitos de la sangre expuesta, medida después de la prueba. La ausencia de trombogenia en una superficie preparada según un método descrito en la presente memoria viene indicado por una reducción del número de trombocitos de la sangre a una cantidad sustancialmente más baja (p. ej., la reducción del número de trombocitos después de la prueba para la sangre expuesta en la superficie revestida es de menos del 20%, preferiblemente menos del 15% y más preferiblemente menos del 10%).

Otros métodos de evaluación de la sangre similares que son diferentes al modelo en asa de sangre los pueden realizar los expertos en la técnica para valorar la capacidad de trombogenia y la ausencia de trombogenia.

La cantidad de restos de heparina fijados a una superficie concreta se puede controlar con facilidad y se puede ajustar mediante la elección de tamaños y cantidades concretos de la molécula hiperramificada para el revestimiento.

La distribución de los restos de heparina sobre la superficie se puede determinar mediante técnicas de tinción convencionales que se conocen por sí mismas, p. ej., la distribución de la heparina se puede determinar con azul de toluidina.

Agentes beneficiosos dentro del revestimiento

El revestimiento de capas del dispositivo, en particular un producto sanitario, podría comprender uno o más agentes beneficiosos además de los restos de heparina. Los agentes beneficiosos de ejemplo incluyen las moléculas farmacológicas y los lubricantes. El agente beneficioso se podría introducir en las capas internas o en la capa externa del revestimiento.

Los agentes beneficiosos podrían estar unidos al revestimiento mediante un enlace covalente, que podría ser degradable para permitir la migración (a saber, elución) del agente beneficioso desde la superficie de polímero, o podría no ser degradable si se requiere una acción duradera. Como alternativa, podrían estar adsorbidos o incorporados dentro de la superficie del revestimiento (p. ej., dentro de cualquiera de sus capas) sin formar ningún enlace covalente.

En los productos sanitarios, podría ser adecuado unir moléculas farmacológicas a un polímero hiperramificado del revestimiento de capas (p. ej., un polímero hiperramificado de la capa externa del revestimiento) además del resto de heparina. En una realización, el enlace entre las moléculas farmacológicas y el revestimiento es un enlace covalente degradable para permitir la migración (a saber, elución) de las moléculas farmacológicas desde la superficie del polímero. Como alternativa, el fármaco podría estar adsorbido o incorporado dentro de la superficie de revestimiento sin un enlace covalente. Los fármacos también podrían estar incorporados en los vacíos del polímero hiperramificado antes de su uso en la construcción del revestimiento. En particular, los fármacos hidrófobos podrían estar incorporados en los vacíos hidrófobos del polímero hiperramificado. Una aplicación específica de esto es en los muelles endovasculares que eluyen fármacos. Los fármacos de ejemplo que se podrían utilizar en esta realización incluyen fármacos que impiden la reestenosis, tales como los fármacos antiangiogénicos o antiproliferativos, tales como el paclitaxel y el sirolimus. Otra aplicación es el uso de heparina, u otras entidades anticoagulantes, que se pueden eluir. En otra realización, un fármaco antimicrobiano podría estar fijado al revestimiento, además del resto de heparina.

Cuando los agentes beneficiosos están unidos covalentemente a una molécula del revestimiento, esto se podría conseguir mediante la unión covalente del uno o varios agentes beneficiosos a las moléculas del polímero hiperramificado catiónico tal y como se describe en la presente memoria a través de grupos funcionales terminales que no están implicados en la unión al resto de heparina. Estos grupos funcionales terminales podrían ser la funcionalidad original (p. ej., amina primaria) o la funcionalidad podría cambiarse antes de la unión al agente beneficioso. El acoplamiento de los agentes beneficiosos se podría realizar de una manera parecida, tal y como se describió anteriormente, a la del acoplamiento de los restos de heparina.

Los agentes beneficiosos podrían estar acoplados a polímeros hiperramificados de la invención antes de la unión a los restos de heparina, aunque, lo más habitual es que se acoplen después.

De forma más general, el revestimiento de capas del dispositivo (p. ej., un producto sanitario) podría comprender optativamente al menos un agente beneficioso seleccionado de: paclitaxel, un taxano u otro análogo del paclitaxel; estrógeno o derivados de estrógenos; heparina u otro inhibidor de la trombina, hirudina, hirulog, apirasa, argatroban, cetona de D-fenilalanil-L-poli-L-arginilclorometilcetona u otro agente antitrombogénico, o mezclas de los mismos; urocinasa, estreptocinasa, un activador del plasminógeno tisular u otro agente trombolítico, o mezclas de los mismos; un agente fibrinolítico; un inhibidor del vasoespasmio; un bloqueante del canal de calcio, un nitrato, óxido nítrico, promotor del óxido nítrico u otro vasodilatador; aspirina, ticlopidina u otro antiplaquetario; factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV) o análogos del mismo; colchicina u otro antimitótico, u otro inhibidor de microtúbulos; citocalasina u otro inhibidor de la actina; un inhibidor de remodelación; ácido desoxirribonucleico, un nucleótido antisentido u otro agente para la intervención genética y molecular; un inhibidor del ciclo celular (tal como el producto proteico del gen supresor tumoral del retinoblastoma) o análogos del mismo, GP IIb/IIIa, GP Ib-IX u otro inhibidor o receptor de la glucoproteína de la superficie; metotrexato u otro antimetabolito o antiproliferativo; un quimioterápico contra el cáncer; dexametasona, fosfato de sodio y dexametasona, acetato de dexametasona u otro derivado de la dexametasona, u otro corticoide antiinflamatorio; prostaglandina, prostaciclina o análogos de los mismos; un inmunosupresor (tal como ciclosporina o rapamicina (también conocido como sirolimus) y análogos de los mismos); un antimicrobiano (p. ej., compuestos seleccionados del grupo que consiste en diamidinas, yodo y yodóforos, peroxígenos, fenoles, bisfenoles, halofenoles, biguanidas, compuestos de plata, triclosán, clorhexidina, triclocarbán, hexaclorofeno, dibromopropamidina, cloroxilenol, fenol y cresol o combinaciones de los mismos), un antibiótico, eritromicina o vancomicina; dopamina, mesilato de bromocriptina, mesilato de pergolida u otro agonista de la dopamina; u otro radioterápico; compuestos que contienen yodo, compuestos que contienen bario, oro, tantalio, platino, tungsteno u otro metal pesado que funciona como un agente radioopaco; un péptido, una proteína, una enzima, un componente de la matriz extracelular, un componente celular u otro agente biológico; captopril, enalapril u otro inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA); ácido ascórbico, α -tocoferol, superóxido dismutasa, deferoxamina, un 21-aminoesteroide (lasaroide) u otro depurador de radicales libres, quelante de hierro u antioxidante; angiopeptina; una forma ^{14}C -, ^3H -, ^{131}I -, ^{32}P o ^{35}S -radiomarcada u otra forma radiomarcada de cualquiera de los anteriores; o una mezcla de cualquiera de estos.

Otros agentes beneficiosos que se podrían incorporar a la superficie del dispositivo incluyen lubricantes, entre ellos polímeros tales como polímeros hidrófilos o de hidrogel que contienen grupos funcionales polares o cargados que los hacen hidrosolubles. Estos agentes incorporan grupos polares que tienen afinidad por las moléculas de agua en solución y se clasifican en líneas generales como hidrogeles. También podría ser adecuado unir lubricantes al revestimiento además de al resto de heparina. En una realización, el enlace entre los lubricantes y la capa externa del revestimiento podría ser un enlace covalente. Como alternativa, el lubricante podría estar adsorbido iónica o físicamente, sobre la superficie del revestimiento, o estar incorporado dentro de ella, sin ningún enlace covalente. Ejemplos de lubricantes son, pero sin limitarse a ellos, ácido hialurónico, derivados del ácido hialurónico, poli-N-vinilpirrolidona, derivados de la poli-N-vinilpirrolidona, óxido de polietileno, derivados del óxido de polietileno,

5 polietilenglicol, derivados del polietilenglicol, alcohol polivinílico, derivados del alcohol polivinílico, ácido poliacrílico, derivados del ácido poliacrílico, silicio, derivados del silicio, polisacárido, derivados de polisacáridos, poliestireno sulfonado, derivados del poliestireno sulfonado, polialilamina, derivados de polialilamina, polietilenimina, derivados de la polietilenimina, polioxazolina, derivados de la polioxazolina, poliamina, derivados de poliaminas y sus combinaciones. Tales agentes beneficiosos podrían, por ejemplo, estar covalentemente unidos a moléculas del polímero hiperramificado en la capa externa del revestimiento.

10 Cuando un dispositivo tiene varias superficies, el uno o varios agentes beneficiosos podrían estar incorporados en cualquier superficie que sea adecuada para conseguir el efecto beneficioso. Por ejemplo, el uno o varios agentes beneficiosos podrían estar incorporados en la superficie de un dispositivo tubular en cualquiera o en ambos de los lados luminal y abluminal. Cuando se incorpora más de un agente beneficioso, los diferentes agentes beneficiosos se podrían incorporar en la misma superficie, o parte de la superficie, o diferentes superficies o partes de la superficie.

Los dispositivos de la invención podrían tener una o varias de las siguientes ventajas en al menos algunas realizaciones:

- 15 • Se podría controlar la cantidad de restos de heparina acoplados a la capa más externa;
- Se podría controlar la longitud de la conexión covalente (conector(es) y espaciador(es)) entre el resto de heparina y el polímero hiperramificado;
- Se podría utilizar heparina completa para así evitar la escisión de la heparina y, así pues, optimizar el uso del material bruto de heparina;
- 20 • El uso de la heparina completa o de la heparina unida mediante un espaciador podría mejorar la bioactividad de la heparina fijada;
- Se puede obtener una distribución uniforme del resto de heparina sobre la capa externa del revestimiento;
- Se podría obtener un revestimiento uniforme que enmascarará las propiedades intrínsecas, por ejemplo, disminución de las propiedades trombogénicas, de un dispositivo independientemente del material con el que esté fabricado;
- 25 • Se podría obtener un revestimiento que es comparativamente suave y/o lubricado;
- Se puede controlar y mejorar la biodisponibilidad del resto de heparina;
- Se podría obtener un revestimiento no trombogénico que no lixivia la heparina y, por lo tanto, tendría una vida útil dilatada;
- 30 • Se podría obtener un revestimiento cuyas propiedades se conservan tras el envejecimiento;
- Se podría obtener un revestimiento cuyas propiedades se conservan tras la esterilización (p. ej., con OE);
- Se podría obtener un revestimiento autocicatrizante debido a la posibilidad de la formación reversible de interacciones iónicas entre las capas;
- 35 • Se podría disminuir al mínimo el número de etapas para la preparación del revestimiento mediante el uso de componentes prefabricados;
- Se podría obtener un procedimiento de fabricación robusto mediante el uso de componentes prefabricados;
- Se podría preparar un revestimiento en el que un conjugado preparado con anterioridad que lleve unido covalentemente la heparina se podría utilizar en el procedimiento de construcción del revestimiento;
- Se podría mejorar la biocompatibilidad del revestimiento preparado;
- 40 • Un revestimiento de acuerdo con la presente invención podría reducir la necesidad de heparina sistémica y reducir la probabilidad de la activación por contacto;
- Se puede obtener un producto sanitario que tiene una combinación de lubricación y tromborresistencia que podría ser beneficioso en determinadas aplicaciones, p. ej., en las aplicaciones neurovasculares;
- 45 • Se podría obtener un producto sanitario que tiene una combinación de propiedades de elución del fármaco y tromborresistencia que podría ser beneficioso en determinadas aplicaciones, p. ej., en las endoprótesis vasculares que eluyen fármacos y en los globos que eluyen fármacos;

- Se puede obtener un producto sanitario que tiene una combinación de propiedades antiinflamatorias y tromborresistencia que podría ser beneficioso en determinadas aplicaciones, p. ej., en las aplicaciones cardiovasculares;

5 • Se podría obtener un dispositivo analítico o de separación con una mejora de la capacidad de fijación a las biomoléculas; y

- Se podría obtener un dispositivo analítico o de separación cuya vida útil de actividad de la heparina esté extendida.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, pero de ningún modo se limita a ellos:

Ejemplos

10 Todas las muestras de Lupasol® se compararon a BASF. Lupasol® WF (centro de etilendiamina) tiene una masa molecular media de 25 kDa, según se determina con la dispersión óptica. El sulfato de dextrano se compró a pK Chemicals A/S (PKC) y los dendrímeros de PAMAM (centro de etilendiamina) se compraron a Sigma Aldrich y Dendritech. La PAMAM-G6.0-NH₂ es un dendrímero de PAMAM (6.^a generación) con una masa molecular de aproximadamente 60 kDa. La PAMAM-G8.0-NH₂ es un dendrímero de PAMAM (8.^a generación) con una masa molecular de aproximadamente 230 kDa. El dendrímero de PPI G5 (centro de butano-1,4-diamina) se compró a Aldrich. La PPI G5 es un dendrímero (5.^a generación) con una masa molecular de aproximadamente 7 kDa. La poliamina Epomin P-1050 (centro de etilendiamina) se compró a Nippon Shokubai y tiene una masa molecular media de 70 kDa. La poliamina G-35 se compró a Wuhan Bright Chemicals y tiene una masa molecular media de 70 kDa. Todas las soluciones de reserva de poliaminas eran del 5% en peso en agua. La solución de reserva de sulfato de dextrano era del 6% en peso en agua. Las soluciones se diluyeron posteriormente cuando fue necesario antes de utilizarlas. Se realizó un enjuague con agua entre cada etapa del procedimiento cuando fue necesario.

Título de los ejemplos

1. Preparación de la capa interna
2. Preparación de un revestimiento no trombogénico que comprende un polímero hiperramificado en la capa externa del revestimiento
3. Preparación de un revestimiento no trombogénico que comprende un polímero hiperramificado funcionalizado con heparina preparada con anterioridad en la capa externa del revestimiento
4. Entidades de heparina modificada
5. Polímeros hiperramificados modificados
6. Evaluación de la densidad de heparina y de la trombocitopenia
7. Preparación de los intermedios
8. Preparación de los revestimientos hidrófilo y lubricante
9. Preparación de revestimientos que eluyen fármacos
10. Estudio de biocompatibilidad
11. Hemocompatibilidad de revestimientos esterilizados con OE que comprenden polímeros hiperramificados

Los ejemplos marcados con un asterisco (*) no forman parte de la presente invención y se incluyen solo con el propósito de referencia.

Ejemplo 1. Preparación de la capa interna

Ejemplo 1.1: Preparación de la capa interna que comprende Lupasol® SN

40 Se trató previamente una superficie de PVC mediante el método descrito por Larm et al. en las patentes europeas EP-B-0086186 y EP-495820 (capa por capa; interacciones de carga entre polielectrolitos) que terminan con una capa de polisacárido sulfatado.

45 La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SN, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprima con 3 bicapas que terminan con el polisacárido sulfatado.

Ejemplo 1.2: Preparación de la capa interna que comprende Lupasol® WF

Se trató previamente una superficie de PVC mediante el método descrito por Larm et al. en las patentes europeas EP-B-0086186 y EP-495820 (capa por capa; interacciones de carga entre polielectrolitos) que terminan con una capa de polisacárido sulfatado.

- 5 La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® WF, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprima con 3 bicapas que terminan con el polisacárido sulfatado.

10 **Ejemplo 1.3:** Preparación de la capa interna que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂

Se revistieron cristales de Quartz Crystal Microbalance (QCM) cubiertos de oro (Q-Sense) según el ejemplo 1.1 con el uso de PAMAM-G6.0-NH₂ al 5% en peso en MeOH (1 ml/l) para obtener un revestimiento de 3 bicapas que consiste en capas alternantes de PAMAM-G6.0-NH₂ y un polisacárido sulfatado (6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. La superficie de oro se imprimó con 3 bicapas que terminan con el polisacárido sulfatado.

Ejemplo 1.4: Preparación de la capa interna que comprende Lupasol® SK y el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina

- 20 La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SK, 5% en agua, 10 minutos) y el conjugado de PAMAM-heparina cargado negativamente (400 mg/l, del ejemplo 5.2, 20 minutos). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y conjugado PAMAM-heparina se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas que terminan con el conjugado PAMAM-heparina del ejemplo 5.2.

25 **Ejemplo 1.5:** Preparación de la capa interna mediante Lupasol® WF y el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina

- 30 La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® WF, 5% en agua, 10 minutos) y el conjugado de PAMAM-heparina cargado negativamente (400 mg/l, del ejemplo 5.2, 20 minutos). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y conjugado PAMAM-heparina se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas que terminan con el conjugado PAMAM-heparina del ejemplo 5.2.

Ejemplo 1.6: Preparación de la capa interna que comprende G-35

- 35 La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (G-35, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconecta con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprima con 3 bicapas que terminan con el polisacárido sulfatado.

Ejemplo 1.7: Preparación de las capas internas mediante Lupasol® SK

- 40 La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SK, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprima con 3 bicapas que terminan con el polisacárido sulfatado.

45 **Ejemplo 1.8:** Preparación de las capas internas mediante Epomin P-1050

- 50 La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Epomin P-1050, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprima con 3 bicapas que terminan con el polisacárido sulfatado.

Ejemplo 2. Preparación de un revestimiento no trombogénico que comprende un polímero hiperramificado en la capa externa del revestimiento

Ejemplo 2.1: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Lupasol® WF sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

- 5 Una solución de Lupasol® WF (5% en peso) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.1 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

Ejemplo 2.2: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Lupasol® WF sobre la capa interna que comprende Lupasol® WF

- 15 Una solución de Lupasol® WF (5% en peso) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.2 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

- 20 ***Ejemplo 2.3:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

- 25 Una solución de PAMAM-G6.0-NH₂ (5% en peso) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.1 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

***Ejemplo 2.4:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ sobre la capa interna que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂

- 30 Una solución de PAMAM-G6.0-NH₂ (5% en peso) se dejó adsorber durante 30 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.3 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

- 35 **Ejemplo 2.5:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende G-35 sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

- 40 Una solución de G-35 (5% en peso) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.1 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

Ejemplo 2.6: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende G-35 sobre la capa interna que comprende G-35

- 45 Una solución de G-35 (5% en peso) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.6 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

Ejemplo 2.7: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Lupasol® WF al 10% en peso y Lupasol® SN al 90% en peso sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

Una mezcla de Lupasol® WF al 10% en peso (5% en peso en solución) y Lupasol® SN al 90% en peso (5% en peso en solución) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.1

seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

Ejemplo 2.8: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Lupasol® WF al 10% en peso y Lupasol® SK al 90% en peso sobre la capa interna que comprende Lupasol® SK

Una mezcla de Lupasol® WF al 10% en peso (5% en peso en solución) y Lupasol® SK al 90% en peso (5% en peso en solución) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.7 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

Ejemplo 2.9: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Lupasol® WF sobre la capa interna que comprende Lupasol® SK

Una solución de Lupasol® WF (5% en peso) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.7 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

Ejemplo 2.10: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Epomin P-1050 sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

Una solución de Epomin P-1050 (5% en peso) se dejó adsorber durante 10 minutos a la superficie del revestimiento prefabricado del ejemplo 1.1 seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, mediante el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento no trombogénico fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación de sus propiedades no trombogénicas.

Ejemplo 2.11: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Lupasol® WF heparinizado sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

El Lupasol® WF (5% en peso en agua) se dejó adsorber sobre una capa interna descrita esencialmente como en el ejemplo 1.1 que produce una superficie cargada positivamente. La heparina de sodio (325 mg/l) se unió posteriormente a la capa cargada positivamente mediante el uso de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (23,35 mg/l) a temperatura ambiente durante 60 minutos seguido de un enjuague con borato/fosfato para retirar cualquier heparina fijada débilmente antes de la evaluación del efecto no trombogénico del revestimiento.

Ejemplo 2.12: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Lupasol® WF funcionalizado con apirasa sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

La apirasa, ≥ 200 unidades/mg de proteína, procedente de patata, se compró a Sigma-Aldrich. El contenido carboxílico en la apirasa se calculó que era aproximadamente de 90 mol de COOH por 1 mol de apirasa basado en un análisis de aminoácidos realizado por Aminosyraanalyscentralen, Suecia. Los grupos carboxílicos en los agentes no trombogénicos, tales como la apirasa, se podrían utilizar para unirlos a una amina que contiene el polímero hiperramificado mediante reactivos de EDC, o similares a la EDC, esencialmente como se describe en el ejemplo 2.11.

Ejemplo 3. Preparación de un revestimiento no trombogénico que comprende un polímero hiperramificado funcionalizado con heparina preparado con anterioridad en la capa externa del revestimiento

***Ejemplo 3.1:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SN, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas y una capa de Lupasol® SN. El dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina (150 mg/l) del ejemplo 5.2 se depositó sobre el revestimiento de

Lupasol® SN cargado positivamente durante 1 hora seguido de un enjuague con borato/fosfato para retirar cualquier conjugado de heparina fijada débilmente antes de la evaluación del efecto no trombogénico del revestimiento.

***Ejemplo 3.2:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina sobre la capa interna que comprende Lupasol® SK, Lupasol® WF y el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina

La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SK, 5% en peso en agua) y el conjugado de PAMAM-heparina cargado negativamente (400 mg/l, del ejemplo 5.2). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y conjugado PAMAM-heparina se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas tal y como está descrito (véase también el ejemplo 1.4) seguido de una capa de Lupasol® WF. El dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina (400 mg/l) del ejemplo 5.2 se depositó sobre el revestimiento de Lupasol® WF cargado positivamente durante 20 minutos seguido de un enjuague con agua para retirar cualquier conjugado de heparina fijada débilmente antes de la evaluación del efecto no trombogénico del revestimiento.

***Ejemplo 3.3:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina sobre la capa interna que comprende Lupasol® WF y el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina

La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® WF, 5% en peso en agua) y el conjugado de PAMAM-heparina cargado negativamente (400 mg/l, del ejemplo 5.2). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y conjugado PAMAM-heparina se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas tal y como está descrito (véase también el ejemplo 1.5) seguido de una capa de Lupasol® WF. El dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina (400 mg/l) del ejemplo 5.2 se depositó sobre el revestimiento de Lupasol® WF cargado positivamente durante 20 minutos seguido de un enjuague con agua para retirar cualquier conjugado de heparina fijada débilmente antes de la evaluación del efecto no trombogénico del revestimiento.

***Ejemplo 3.4:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SN, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas y una capa de Lupasol® SN. El dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina (425 mg/l) del ejemplo 5.2 se depositó sobre el revestimiento de Lupasol® SN cargado positivamente durante 1 hora seguido de un enjuague con borato/fosfato para retirar cualquier conjugado de heparina fijada débilmente antes de la evaluación del efecto no trombogénico del revestimiento.

Ejemplo 3.5: Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende Lupasol® WF funcionalizado con heparina sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SN, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas y una capa de Lupasol® SN. El Lupasol® WF funcionalizado con heparina (425 mg/l) del ejemplo 5.3 se depositó sobre el revestimiento de Lupasol® SN cargado positivamente durante 1 hora seguido de un enjuague con borato/fosfato para retirar cualquier conjugado de heparina fijada débilmente antes de la evaluación del efecto no trombogénico del revestimiento.

***Ejemplo 3.6:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G8.0-NH₂ funcionalizado con heparina sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SN, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas y una capa de Lupasol® SN. El dendrímero de PAMAM-G8.0-NH₂ funcionalizado con heparina (425 mg/l) del ejemplo 5.6 se depositó sobre el revestimiento de Lupasol® SN cargado positivamente durante 1 hora seguido de un enjuague con borato/fosfato para retirar cualquier conjugado de heparina fijada débilmente antes de la evaluación del efecto no trombogénico del revestimiento.

***Ejemplo 3.7:** Preparación de la capa externa del revestimiento que comprende el dendrímero de PPI G5 funcionalizado con heparina sobre la capa interna que comprende Lupasol® SN

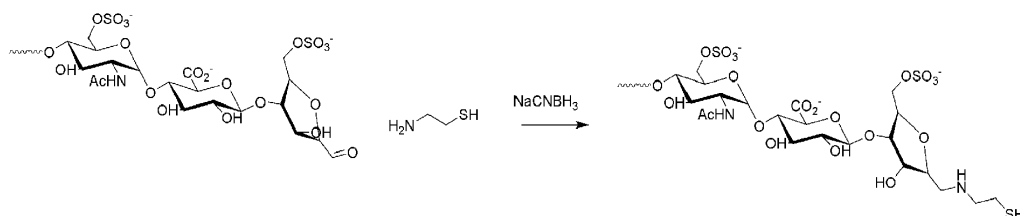
La superficie luminal de un tubo de PVC (D. I. 3 mm) se limpió con isopropanol y un oxidante. La imprimación se construyó mediante la adsorción alternada de una poliamina cargada positivamente (Lupasol® SN, 5% en peso en agua) y un polisacárido sulfatado cargado negativamente (sulfato de dextrano, 6% en peso en agua). La poliamina se interconectó con un aldehído difuncional (crotonaldehído). Cada pareja de poliamina y polisacárido sulfatado se denomina una bicapa. La superficie de PVC se imprimó con 3 bicapas y una capa de Lupasol® SN. El dendrímero de PPI G5 funcionalizada con heparina (425 mg/l) del ejemplo 5.7 se depositó sobre el revestimiento de Lupasol® SN cargado positivamente durante 1 hora seguido de un enjuague con borato/fosfato para retirar cualquier conjugado de heparina fijada débilmente antes de la evaluación del efecto no trombogénico del revestimiento.

Ejemplo 4. Entidades con heparina modificada

Ejemplo 4.1: Preparación de heparina funcionalizada en el extremo con aldehído

La heparina funcionalizada con aldehído se prepara esencialmente como en el ejemplo 2 de la patente de los EE. UU. US 4.613.665.

Ejemplo 4.2: Preparación de heparina funcionalizada en el extremo con tiol



La heparina degradada con ácido nitroso con grupos aldehído (preparada esencialmente como en el ejemplo 2 de la patente de los EE. UU. US 4.613.665) (5,00 g, 1,0 mmol), el hidrocloreto de cisteamina (0,57 g, 5,0 mmol) y el cloruro de sodio (0,6 g) se disolvieron en agua purificada. El pH se ajustó a 6,0 con NaOH a 1 M (aq.) y HCl a 1 M (aq.) A la solución se le añadieron 3,1 ml de NaCNBH₃ al 5% (aq.) (0,16 g, 2,5 mmol) y la reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente. El pH se ajustó a 11,0 con NaOH a 1 M (aq.) y el producto resultante se dializó contra agua purificada con una membrana de diálisis SpectraPor (MWCO 1kD, anchura plana de 45 mm) durante tres días. A continuación, se concentró la mezcla de reacción y se liofilizó para obtener 2,6 g de un polvo algodonoso blanco.

Ejemplo 4.3: Preparación de heparina funcionalizada en el extremo con alquino

La heparina degradada con ácido nitroso y funcionalizada con alquino se prepara esencialmente como en el ejemplo 3a de la solicitud de patente internacional WO 2010/029189.

Ejemplo 4.4: Preparación de la heparina nativa funcionalizada en el extremo con alquino

La heparina nativa funcionalizada con alquino se preparó esencialmente como en el ejemplo 3b de la solicitud de patente internacional WO 2010/029189.

Ejemplo 4.5: Preparación de la heparina funcionalizada en el extremo con azida y de la heparina nativa funcionalizada con azida

La heparina degradada con ácido nitroso y funcionalizada con azida, y la heparina nativa funcionalizada con azida, se prepara esencialmente como en el ejemplo 4 de la solicitud de patente internacional WO 2010/029189.

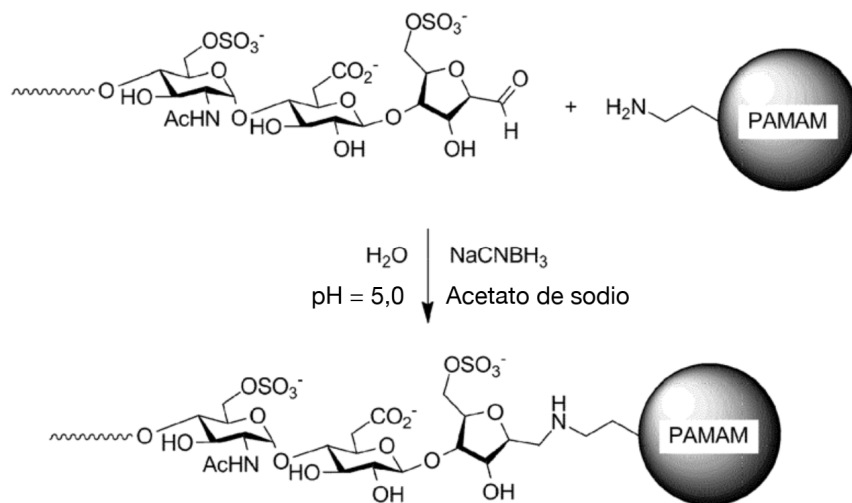
Ejemplo 5. Polímeros hiperramificados modificados

***Ejemplo 5.1:** Preparación del dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con alqueno

Se preparó una solución concentrada con 3,75 mg de ácido 5-hexenoico activado con NHS/ml de MeOH. Véase el ejemplo 7.1 para la preparación del alqueno activado con NHS.

Se añadieron 2 ml de una solución de PAMAM-G6.0-NH₂ al 5% en peso en MeOH a 1 ml de la solución concentrada (3,75 mg del ácido 5-hexenoico activado con NHS) y 9 ml de MeOH (0 °C). Se dejó que la reacción transcurriera durante una noche. Se evaporó el solvente en un rotavapor y un horno al vacío. La gran pureza del material obtenido se confirmó mediante ¹H- y ¹³C-RMN. Se obtuvo un grado de funcionalización del 2% (5-6 alquenos/dendrímero).

***Ejemplo 5.2:** Preparación del dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ funcionalizado con heparina con conservación de la actividad específica



La heparina funcionalizada en el extremo con aldehído, del ejemplo 4.1, (5,0 g, 0,56 mmol) se disolvió en 15 ml de tampón de acetato (pH = 5,0) con agitación vigorosa. Se le añadieron 2 ml de una solución al 5% en peso del dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ (centro de etilendiamina) (80,6 mg, 1,39 μmol) en MeOH a la solución de heparina seguido de la adición de 10 ml de cianoborohidruro de sodio (2,5% en peso en H₂O). Se dejó la solución en agitación en la campana de extracción de gases durante una noche a temperatura ambiente. Se transfirió la solución a una bolsa de diálisis (MWCO 50.000 Da) y se dializó exhaustivamente. Después, el contenido de la bolsa de diálisis se transfirió a un matraz con fondo redondo y se liofilizó durante una noche. El peso seco del contenido del matraz era de 830 mg (~60 cadenas de heparina/dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ o funcionalización del 23% de las aminas primarias en PAMAM-G6.0-NH₂). La actividad específica de la heparina fijada a PAMAM en el conjugado se determinó que era >100 UI/mg. La heparina utilizada para la preparación, antes del acoplamiento, tiene una actividad específica de aproximadamente 100 UI/mg.

Ejemplo 5.3: Preparación de Lupasol® WF funcionalizado con heparina con conservación de la actividad específica

El Lupasol® WF funcionalizado con heparina se preparó esencialmente como se describe en el ejemplo 5.2.

Ejemplo 5.4: Preparación de Lupasol® WF funcionalizado con azida

El Lupasol® WF funcionalizado con azida se puede preparar esencialmente como está descrito para el Lupasol® SN en el ejemplo 2a de la solicitud de patente internacional WO 2010/029189.

Ejemplo 5.5: Preparación de Lupasol® WF funcionalizado con alquino

El Lupasol® WF funcionalizado con alquino se puede preparar esencialmente como está descrito para el Lupasol® SN en el ejemplo 2b de la solicitud de patente internacional WO 2010/029189.

***Ejemplo 5.6:** Preparación del dendrímero de PAMAM-G8.0-NH₂ funcionalizado con heparina con conservación de la actividad específica

El PAMAM-G8.0-NH₂ funcionalizado con heparina se preparó esencialmente como está descrito en el ejemplo 5.2.

***Ejemplo 5.7:** Preparación del dendrímero de PPI G5 funcionalizado con heparina con conservación de la actividad específica

El dendrímero de PPI G5 funcionalizado con heparina se preparó esencialmente como está descrito en el ejemplo 5.2.

Ejemplo 5.8: Preparación de polímeros hiperramificados funcionalizados

Los polímeros hiperramificados con grupos químicos, o funcionalidades, seleccionados de la tabla 3 (Func. grupo 1 y Func. grupo 2) los podría preparar cualquier experto en la técnica.

Las entidades no trombogénicas (p. ej., heparina) con los grupos químicos, o funcionalidades, seleccionados de la tabla 3 (Func. grupo 1 y Func. grupo 2) los podría preparar cualquier experto en la técnica.

Un experto en la técnica podría hacer reaccionar los polímeros hiperramificados funcionalizados con una entidad no trombogénica funcionalizada (p. ej., heparina) para producir un polímero hiperramificado que está modificado con una entidad no trombogénica (p. ej., heparina).

Ejemplo 6. Evaluación de la densidad de heparina y trombocitopenia

- 5 Prueba de densidad de la heparina (para medir el contenido de heparina en el revestimiento)

La cuantificación de la heparina inmovilizada en la superficie se realizó esencialmente como se describe en Smith R. L. y Gilkerson E. (1979), *Anal. Biochem.*, 98, 478-480.

Prueba de tinción con azul de toluidina (para evaluar la distribución de la heparina)

- 10 La distribución de la heparina se evalúa con el uso de soluciones de tinción con azul de toluidina. La solución se preparó mediante la disolución de 200 mg de azul de toluidina en 1 l de agua. Las muestras se sometieron a la solución de tinción durante 2 minutos antes de lavar exhaustivamente con agua. La tinción azul/violeta indica que las moléculas de heparina cargadas negativamente están distribuidas homogéneamente en la capa externa del revestimiento, tal y como se ejemplifica en la placa B de la figura 9.

Prueba de evaluación en asa de sangre (para medir la trombocitopenia)

- 15 Se realizó la evaluación de las muestras en el asa de sangre, a medida que se revestían, para demostrar la conservación de la bioactividad de la heparina que tiene la superficie no trombogénica. Primero, el lado luminal del tubo revestido se lavó con NaCl a 0,15 M durante 15 horas a un flujo de 1 ml/min para garantizar que toda la heparina fijada débilmente se retiraba con el enjuague y que se queda una superficie estable. A continuación, los tubos lavados se incubaron en un modelo de asa de Chandler esencialmente de acuerdo con Andersson et al. (Andersson, J.; Sanchez, J.; Ekdahl, K. N.; Elgue, G.; Nilsson, B.; Larsson, R. *J Biomed Mater Res A* 2003, 67(2), 458-466) a 20 rpm. Los trombocitos, de sangre de nueva aportación y de sangre recogida de las asas, se contaron en un contador de células para medir la pérdida de trombocitos, lo que indica trombosis.
- 20

Ejemplo 6.1: Propiedades del revestimiento en términos de densidad de heparina y trombocitopenia, después de la exposición de la sangre, que tiene la superficie no trombogénica

Ejemplo n.º	Poliamina en la capa interna	Polímero con carga negativa en la capa interna	Polímero hiperramificado en la capa externa del revestimiento	Densidad ^a de heparina [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Tinción ^b con azul de toluidina	Trombocitos perdidos [%]
1.1	Lupasol® SN	PS*	N/A**	N/A**	No	N/A**
1.2	Lupasol® WF	PS*	N/A**	N/A**	No	N/A**
2.1	Lupasol® SN	PS*	Lupasol® WF	4,7	Sí	0
2.2	Lupasol® WF	PS*	Lupasol® WF	5,3	Sí	0
2.3	Lupasol® SN	PS	PAMAM-G6.0-NH ₂	1,4	Sí	8
2.4	PAMAM-G6.0-NH ₂	PS	PAMAM-G6.0-NH ₂	5,1	Sí	N/T***
2.5	Lupasol® SN	PS*	G-35 [70 kDa]	7,6	Sí	0
2.6	G-35 [70 kDa]	PS*	G-35 [70 kDa]	3,9	Sí	1
2.7	Lupasol® SN	PS*	Lupasol® WF	5,5	Sí	N/T***
2.8	Lupasol® SK	PS*	Lupasol® WF	3,5	Sí	3

Ejemplo n.º	Poliamina en la capa interna	Polímero con carga negativa en la capa interna	Polímero hiperramificado en la capa externa del revestimiento	Densidad ^a de heparina [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Tinción ^b con azul de toluidina	Trombocitos perdidos [%]
2.9	Lupasol® SK	PS*	Lupasol® WF	8,6	Sí	1
2.10	Lupasol® SN	PS*	Epomin-P-1050	8,4	Sí	N/T***
2.11	Lupasol® SN	PS*	Lupasol® WF	5,1	Sí	0
3.1	Lupasol® SN	PS	PAMAM-G6.0-NH ₂ ^c	0,6	Sí	5
*3.2	Lupasol® SK y Lupasol® WF	PAMAM-G6.0-NH ₂ ^c	PAMAM-G6.0-NH ₂ ^c	3,8	Sí	1
*3.3	Lupasol® WF	PAMAM-G6.0-NH ₂ ^c	PAMAM-G6.0-NH ₂ ^c	4,0	Sí	1
3.4	Lupasol® SN	PS	PAMAM-G6.0-NH ₂ ^c	0,9	Sí	14
3.5	Lupasol® SN	PS*	Lupasol WF ^c	3,5	Sí	7
3.6	Lupasol® SN	PS	PAMAM-G8.0-NH ₂ ^c	0,6	Sí	12
3.7	Lupasol® SN	PS	PPI G5 ^c	1,7	Sí	15
PVC sin revestir	** N/A	** N/A	** N/A	** N/A	No	94
Control de coagulación	** N/A	* PS	** N/A	** N/A	*** N/T	95

^a Media a partir de 2 valores

^b Sí significa tinción de color azul/violeta, No significa que no se tiñó en absoluto

^c Depósito del conjugado hiperramificado con heparina preparado con anterioridad

* PS = Polisacárido

** N/A = No aplicable

*** N/T = Sin comprobar

El número de trombocitos presentes después de exponer la sangre al revestimiento de la superficie no trombogénica se calculó como un porcentaje del número de trombocitos presentes antes de exponer la sangre al revestimiento no trombogénico de la superficie y se presenta gráficamente para diferentes muestras en la figura 8.

- 5 Tal y como se observa en la tabla anterior y en la figura 8, virtualmente no se observa ninguna pérdida de trombocitos (la trombocitopenia indica trombosis) con los revestimientos analizados que contienen heparina. El tubo de PVC sin revestir y la superficie con la capa externa de un polisacárido sulfatado («control de coagulación») muestran una trombosis significativa en este experimento.

Ejemplo 6.2: Tinción de una superficie no trombogénica con azul de toluidina

- 10 El tubo del ejemplo 2.2 se sometió a la tinción con la solución de azul de toluidina (200 mg/l en agua) al sumergirlo en la solución durante 2 minutos seguido de un enjuague con abundante agua. Se observó un color azul/violeta

sobre la superficie de la cara luminal del tubo, lo que indica la unión covalente de la heparina funcionalizada en el extremo.

Ejemplo 6.3: Tinción de una superficie no trombogénica con azul de toluidina

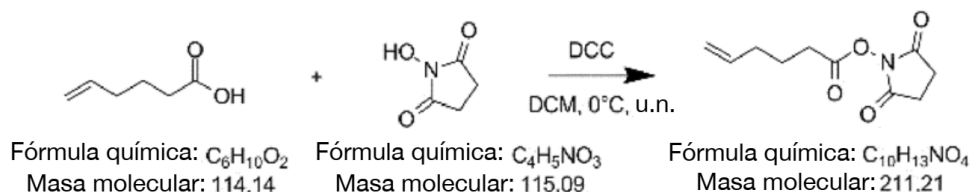
5 El tubo del ejemplo 3.2 (ejemplo de referencia) se sometió a una tinción con solución de azul de toluidina (200 mg/l en agua) al sumergirlo en la solución durante 2 minutos seguido de un enjuague con abundante agua. Se observó un color azul/violeta sobre la superficie de la cara luminal del tubo, lo que indica la unión covalente de la heparina funcionalizada en el extremo en el conjugado PAMAM-heparina. En la figura 9 se puede observar la tinción de la superficie luminal del tubo de PVC.

Ejemplo 6.4: Tinción de una superficie no trombogénica con azul de toluidina

10 El tubo del ejemplo 3.3 (ejemplo de referencia) se sometió a una tinción con la solución de azul de toluidina (200 mg/l en agua) al sumergirlo en la solución durante 2 minutos seguido de un enjuague con abundante agua. Se observó un color azul/violeta sobre la superficie de la cara luminal del tubo, lo que indica la unión covalente de la heparina funcionalizada en el extremo en el conjugado PAMAM-heparina.

Ejemplo 7. Preparación de los intermedios

15 Ejemplo 7.1: Síntesis del ácido 5-hexenoico activado con NHS



20 Se disolvieron el ácido hexenoico (1,00 g, 8,76 mmol) y la hidroxisuccinimida (1,01 g, 8,76 mmol) en 10 ml de DCM y se agitó a 0 °C. Una solución de DCC (1,81 g, 8,76 mmol) en DCM (3 ml) se añadió lentamente gota a gota a la mezcla de reacción a 0 °C. La reacción se dejó en agitación durante una noche tras lo cual los subproductos se retiraron por filtración, y la solución restante se concentró en un rotavapor y se secó al vacío en un horno. La gran pureza del material obtenido se confirmó mediante 1H - y ^{13}C -RMN.

Ejemplo 8. Preparación de revestimientos hidrófilos y lubricados

Ejemplo 8.1: Un revestimiento hidrófilo y lubricado que comprende Lupasol® SK y Lupasol® WF

25 Los cristales de QCM se revistieron con Lupasol® SK de acuerdo con el ejemplo 1.7 para obtener un revestimiento de 3 bicapas que consiste en capas alternantes de Lupasol® SK y un polisacárido sulfatado. Posteriormente, se adsorbió una capa de Lupasol® WF al polisacárido sulfatado para obtener un revestimiento con un polímero hiperramificado catiónico que fuera la capa más externa. Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. Estos revestimientos se analizaron mediante mediciones del ángulo de contacto (AC). Un AC estático de 53,0° (media a partir de dos muestras) reveló que se había obtenido un revestimiento hidrófilo y lubricado.

30 Ejemplo 8.2: Un revestimiento hidrófilo y lubricado que comprende Lupasol® SK, Lupasol® WF y heparina

35 Los cristales de QCM se revistieron con Lupasol® SK de acuerdo con el ejemplo 1.7 para obtener un revestimiento de 3 bicapas que consiste en capas alternantes de Lupasol® SK y un polisacárido sulfatado. Posteriormente, una capa de Lupasol® WF se adsorbió al polisacárido sulfatado seguido de una etapa de acoplamiento de 1 hora de la heparina degradada con ácido nitroso (325 mg/l), del ejemplo 4.1, con el uso de un reductor (cianoborohidruro de sodio, 2,5% en peso en agua). Se realizó un enjuague de 2 min con agua entre cada etapa de adsorción. El revestimiento lubricado que se ha fabricado se trató con una solución de borato/fosfato para retirar cualquier posible heparina fijada iónicamente antes de la evaluación con el uso de mediciones del ángulo de contacto (AC). Un AC estático de 23,5° (media a partir de dos muestras) reveló que se había obtenido un revestimiento hidrófilo y lubricado.

40 Ejemplo 9. Preparación de revestimientos que eluyen fármacos

Ejemplo 9.1: Incorporación de la doxorubicina en un revestimiento heparinizado

45 Se incorporó la doxorubicina en el interior de un revestimiento sobre un cristal de QCM, preparado esencialmente como en el ejemplo 2.3, mediante la colocación del cristal de QCM en una solución acuosa de doxorubicina (1 mg/25 ml de agua). La etapa de carga fue seguida del enjuague cuidadoso del revestimiento cargado con el fármaco mediante el uso de agua antes de la evaluación de la fluorescencia del revestimiento. Se secó el cristal en un horno

al vacío antes de la evaluación de la fluorescencia. Se pudo detectar una fluorescencia roja fuerte, lo que indicó que la doxorubicina se había incorporado satisfactoriamente en el revestimiento.

Ejemplo 9.2: Incorporación de la doxorubicina y la posterior liberación desde un revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ heparinizado, Lupasol® SK y Lupasol® WF

- 5 Se incorporó la doxorubicina en el interior de un revestimiento sobre un cristal de QCM, preparado esencialmente como en el ejemplo 3.2 (ejemplo de referencia), mediante la colocación del cristal de QCM en una solución acuosa de doxorubicina (1 mg/25 ml de agua). La etapa de carga fue seguida del enjuague cuidadoso del revestimiento cargado con el fármaco mediante el uso de agua antes de la evaluación de la fluorescencia del revestimiento. Se secó el cristal en un horno al vacío antes de la evaluación de la fluorescencia. Se pudo detectar una fluorescencia roja fuerte, lo que indicó que la doxorubicina se había incorporado satisfactoriamente en el revestimiento. El revestimiento cargado con el fármaco se sometió a una solución de NaCl a 2 M y a un enjuague final con agua, y le siguió el secado en un horno al vacío antes de la evaluación adicional con microscopia de fluorescencia. La falta de fluorescencia roja indica que la doxorubicina se había eluido desde el revestimiento.

- 15 **Ejemplo 9.3:** Incorporación de la doxorubicina y la posterior liberación desde un revestimiento que comprende el dendrímero de PAMAM-G6.0-NH₂ heparinizado y Lupasol® WF

- 20 La doxorubicina se podría incorporar en un cristal de QCM, preparado esencialmente como en el ejemplo 3.3 (ejemplo de referencia), mediante la colocación del cristal de QCM en una solución acuosa de doxorubicina (1 mg/25 ml de agua) seguido del enjuague cuidadoso con agua del revestimiento cargado con el fármaco antes de la evaluación de la fluorescencia del revestimiento. Una fluorescencia roja fuerte indica que la doxorubicina se había incorporado satisfactoriamente en el revestimiento. El revestimiento cargado con el fármaco se sometió a una solución de NaCl a 2 M y le siguió el secado en un horno al vacío antes de la evaluación adicional con microscopia de fluorescencia. La falta de fluorescencia roja indicaba que la doxorubicina se había eluido desde el revestimiento.

Ejemplo 10: Estudio de biocompatibilidad

Preparación de una superficie biocompatible sobre un polietileno de alta densidad (HDPE, por su nombre en inglés)

- 25 Las hojas de HDPE (30 cm², estándar de referencia de la Farmacopea de los EE. UU.) se limpiaron con isopropanol y un método de oxidación. Las hojas se imprimaron a continuación como en el ejemplo 1 con 3 bicapas que terminan en el polisacárido sulfatado. Las capas de imprimación se hicieron reaccionar como en el ejemplo 2 con una poliamina hiperramificada seguido de una etapa de acoplamiento donde se unió la heparina funcionalizada o, como en el ejemplo 3, primero con una capa de poliamina seguido de un polímero hiperramificado funcionalizado con heparina con carga neta negativa. El revestimiento se realizó al sumergir los materiales en las soluciones de revestimiento. Se halló que los revestimientos no eran tóxicos en una prueba de citotoxicidad mediante la prueba de elución del medio mínimo esencial (MME) tal y como se describe en la ISO10993 (véase el ejemplo 10.1).

Estos resultados demuestran las propiedades biocompatibles no tóxicas que tiene la superficie evaluada.

Ejemplo 10.1: Tabla de biocompatibilidad

Ejemplo n.º	Poliamina en la capa interna	Polímero con carga negativa en la capa interna	Polímero hiperramificado en la capa externa del revestimiento	Pasa	No pasa
2.2	Lupasol® WF	PS*	Lupasol® WF	Sí	
3.6	Lupasol® SN	PS	PAMAM-G8.0-NH ₂ ^a	Sí	
3.7	Lupasol® SN	PS	PPI G5 ^a	Sí	
* PS = Polisacárido					
^a Depósito del conjugado hiperramificado con heparina preparado con anterioridad					

- 35 **Ejemplo 11: Hemocompatibilidad de los revestimientos esterilizados con OE que comprenden polímeros hiperramificados**

Esterilización con OE

- 40 Los sustratos revestidos de manera diferente con un polímero hiperramificado funcionalizado con heparina en la capa externa del revestimiento que se han preparado tal y como se describe en los ejemplos 2 o 3 se sometieron a

esterilización mediante la exposición a óxido de etileno (OE). La esterilización con OE se llevó a cabo mediante los procedimientos de esterilización estándares utilizados para los productos sanitarios.

Prueba de evaluación en asa de sangre (para medir la trombocitopenia)

- 5 Los tubos lavados y esterilizados con OE se incubaron en un modelo de asa de Chandler esencialmente de acuerdo con Andersson et al. (Andersson, J.; Sanchez, J.; Ekdahl, K. N.; Elgue, G.; Nilsson, B.; Larsson, R. *J Biomed Mater Res A* 2003, 67(2), 458-466), véase el ejemplo 6.

- 10 Tal y como se observa en la tabla que viene a continuación, se ve que virtualmente no hay pérdida de trombocitos (la trombocitopenia indica trombosis) para los revestimientos con heparina esterilizados con OE y preparados con los conjugados de heparina hiperramificados preparados según el ejemplo 2 y 3. El tubo de PVC sin revestir y el control de coagulación (la superficie con la capa externa de polisacáridos sulfatados que no se fijan a la antitrombina) muestran una trombosis significativa en este experimento.

Ejemplo 11.1: Presentación de la estabilidad del revestimiento en términos de pérdida de trombocitos en la sangre después de la esterilización con OE

Ejemplo n.º	Poliamina en la capa interna	Polímero con carga negativa en la capa interna	Polímero hiperramificado en la capa externa del revestimiento	Pérdida de trombocitos [%] antes de esterilizar con OE	Pérdida de trombocitos [%] después de esterilizar con OE
2.1	Lupasol® SN	PS*	Lupasol® WF	0	6
2.7	Lupasol® SN	PS*	Lupasol® WF	N/T**	8
3.4	Lupasol® SN	PS	PAMAM-G6.0-NH ₂ ^a	14	6
3.5	Lupasol® SN	PS*	Lupasol WF ^a	7	0
3.6	Lupasol® SN	PS	PAMAM-G8.0-NH ₂ ^a	12	8
3.7	Lupasol® SN	PS	PPI G5 ^a	15	7
PVC sin revestir	N/A***	N/A***	N/A***	97	N/T**
Control de coagulación	N/A***	N/A***	N/A***	96	N/T**

* PS = Polisacárido; ** N/T = Sin comprobar; *** N/A = No aplicable

^a Depósito del conjugado hiperramificado con heparina preparado con anterioridad

- 15 Estos resultados demuestran que las propiedades no trombogénicas de las superficies estables preparadas de acuerdo con la invención se conservan a pesar de la exposición a unas condiciones rigurosas de esterilización.

- 20 A lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones que vienen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra «comprender» y las variaciones tales como «comprende» y «que comprende» se entenderá que implican la inclusión de un mencionado entero, etapa, grupo de enteros o grupo de etapas, pero que no excluye ningún otro entero, etapa, grupo de enteros o grupo de etapas.

La invención abarca todas las combinaciones de grupos preferidos y más preferidos, y grupos idóneos y más idóneos, y realizaciones de los grupos enumerados más arriba.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una molécula de polímero hiperramificado y catiónico que se caracteriza por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 10.000 a 300.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1, y (iv) grupos funcionales terminales, gracias a lo cual uno o varios de dichos grupos funcionales terminales tienen un resto de heparina unido covalentemente por un único punto a ellos, en donde dicho resto de heparina está unido covalentemente por un único punto a la molécula de polímero hiperramificado a través del extremo reductor del resto de heparina, y en donde el polímero hiperramificado no es un dendrímero.
- 10 **2.** Un dispositivo que tiene una superficie que comprende un revestimiento de capas, en donde la capa externa del revestimiento comprende muchas de tales moléculas de polímero hiperramificado catiónico de acuerdo con la reivindicación 1.
- 3.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico de acuerdo con la reivindicación 1 o un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde los restos de heparina son restos de heparina completa o restos de heparina degradados con ácido nítrico.
- 15 **4.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el polímero hiperramificado se selecciona de poliamidoamina, polipropilenimina, polietilenimina y polímeros de poliamina y copolímeros que comprenden uno o varios de poliamidoamina, polipropilenimina, polietilenimina y polímeros hiperramificados de poliamina.
- 20 **5.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los grupos funcionales terminales son grupos de amina primaria.
- 6.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el resto central tiene una masa molecular de 50 a 130 Da.
- 7.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el polímero hiperramificado tiene etilendiamina como resto central.
- 25 **8.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el polímero hiperramificado tiene una masa molecular de 25.000 a 200.000 Da y/o en donde la razón de masa molecular total por masa molecular del resto central es de al menos 100:1.
- 9.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la razón de masa molecular total por masa molecular del resto central está entre 200:1 y 5.000:1.
- 30 **10.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la molécula de polímero hiperramificado tiene un diámetro de 5 a 30 nm y/o las moléculas del polímero hiperramificado están interconectadas para formar agregados de dos o más moléculas del polímero hiperramificado.
- 35 **11.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los restos de heparina están unidos covalentemente a grupos funcionales terminales de la molécula de polímero hiperramificado a través de un conector formado mediante una reacción iniciada por radicales libres.
- 40 **12.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico o un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde un espaciador separa el conector de la molécula de polímero hiperramificado y/o del resto de heparina.
- 13.** Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el revestimiento de capas comprende una o más bicapas de revestimiento de polímero catiónico y polímero aniónico.
- 14.** Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la capa más interna es una capa de polímeros catiónicos.
- 45 **15.** Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, en donde una o más de las capas del revestimiento de capas que no es la capa externa del revestimiento comprende una molécula de polímero hiperramificado catiónico caracterizada por tener (i) un resto central con una masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 1.500 a 1.000.000 Da, (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1, y (iv) grupos funcionales terminales que están optativamente modificados.
- 50 **16.** Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el polímero aniónico es un polisacárido aniónico o un polímero catiónico hiperramificado y funcionalizado con una carga neta negativa.

- 17.** Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16, que es un producto sanitario, un dispositivo analítico o un dispositivo de separación.
- 18.** Un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 17, en donde el revestimiento de capas del dispositivo comprende uno o varios agentes beneficiosos además de los restos de heparina.
- 5 **19.** Un procedimiento para la fabricación de un dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 18, en donde el procedimiento comprende, en cualquier orden:
- i. hacer reaccionar numerosos grupos funcionales terminales de moléculas del polímero hiperramificado con restos de heparina, de tal manera que cada molécula de polímero hiperramificado está covalentemente unida por un solo punto a numerosos restos de heparina a través del extremo reductor del resto de heparina; y
- 10 ii. unir las moléculas del polímero hiperramificado a la superficie de un dispositivo.
- 20.** Una molécula de polímero hiperramificado catiónico de acuerdo con la reivindicación 1 o cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, que tiene una carga neta positiva o una carga neta negativa.
- 21.** Un dispositivo no trombogénico de acuerdo con la reivindicación 2, que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:
- 15 (a) tratar un dispositivo para que presente una capa superficial de polímero cargado positivamente;
- (b) asociar a dicha capa superficial de polímero moléculas del polímero hiperramificado catiónicos y funcionalizados que se caracterizan por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 10.000 a 300.000 Da, y (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1, y que lleva numerosos restos de heparina cargados negativamente, y en donde dicho
- 20 polímero catiónico hiperramificado y funcionalizado tiene una carga neta negativa y no es un dendrímero, en donde dichos restos de heparina están unidos covalentemente por un solo punto al polímero hiperramificado a través del extremo reductor del resto de heparina.
- o,
- que se puede obtener mediante un procedimiento que comprende:
- 25 (a) tratar un dispositivo para que presente una capa superficial de polímero cargado negativamente;
- (b) asociar a dicha capa superficial de polímero moléculas del polímero hiperramificado catiónico funcionalizado que se caracterizan por tener (i) un resto central de masa molecular de 14 a 1.000 Da, (ii) una masa molecular total de 10.000 a 300.000 Da, y (iii) una razón de masa molecular total por masa molecular del resto central de al menos 80:1, y que lleva uno o más restos de heparina cargados negativamente, y en donde dicho
- 30 polímero hiperramificado funcionalizado tiene una carga neta positiva y no es un dendrímero;
- en donde dichos restos de heparina están unidos covalentemente por un solo punto al polímero hiperramificado a través del extremo reductor del resto de heparina.

Figura 1

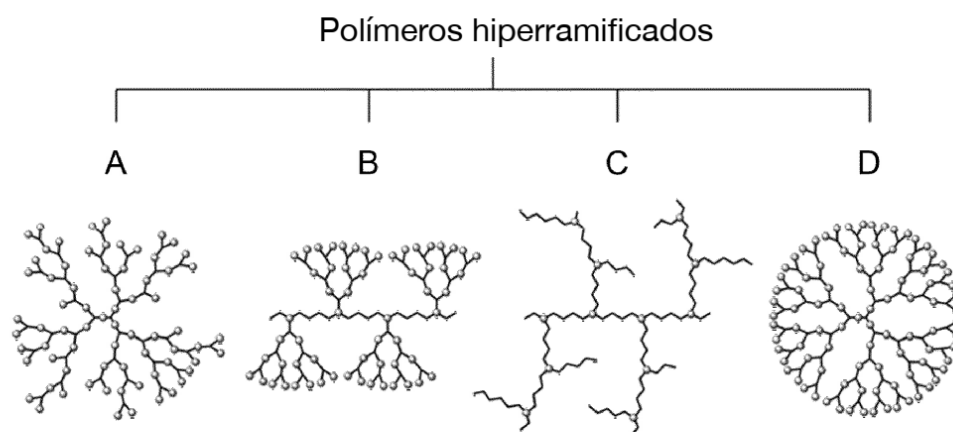


Figura 2

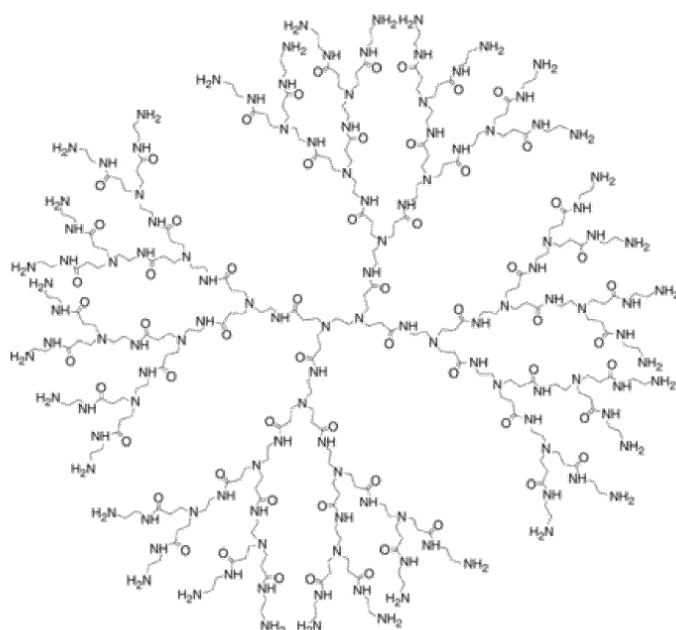


Figura 3

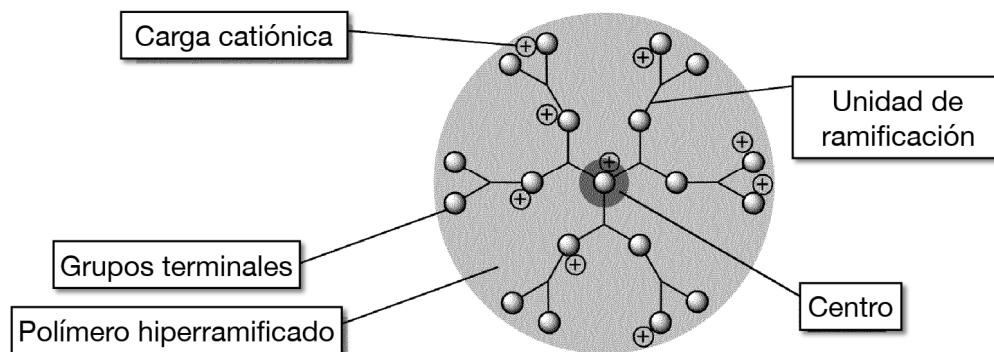


Figura 4

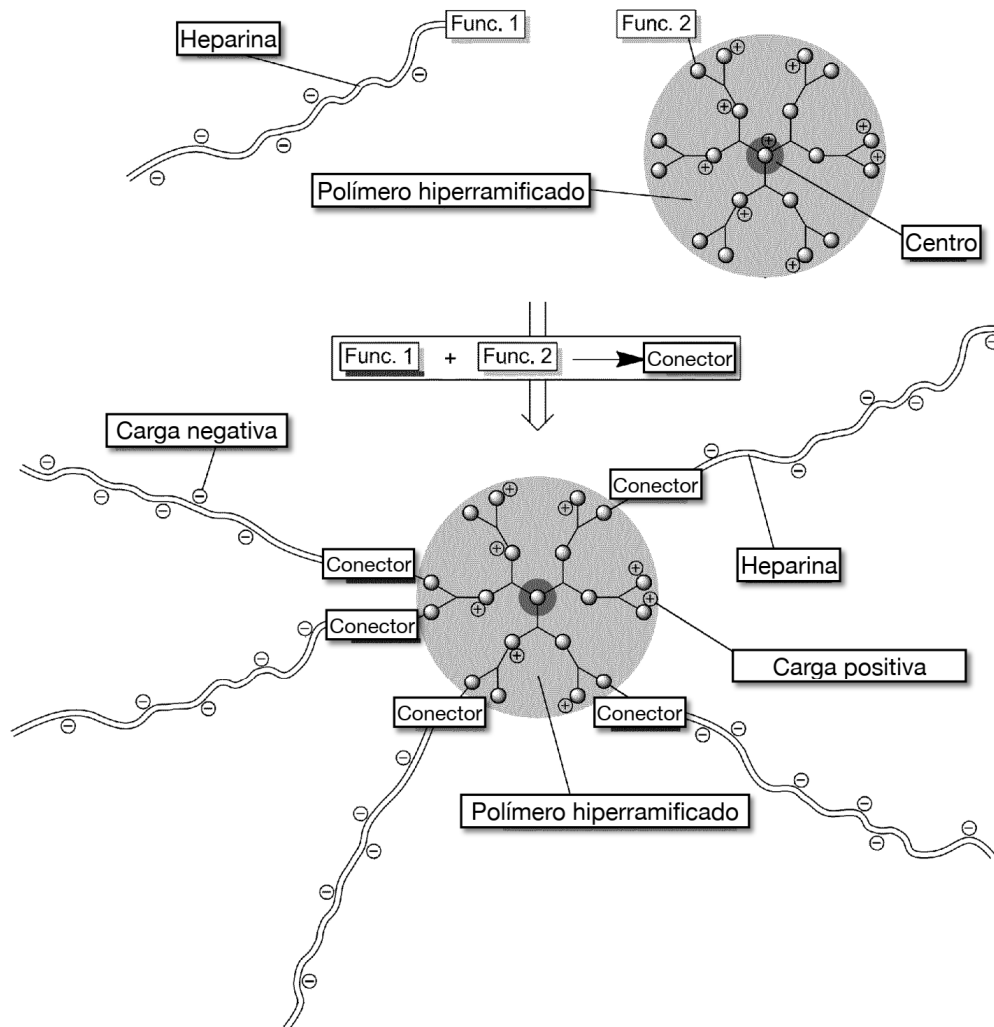


Figura 5

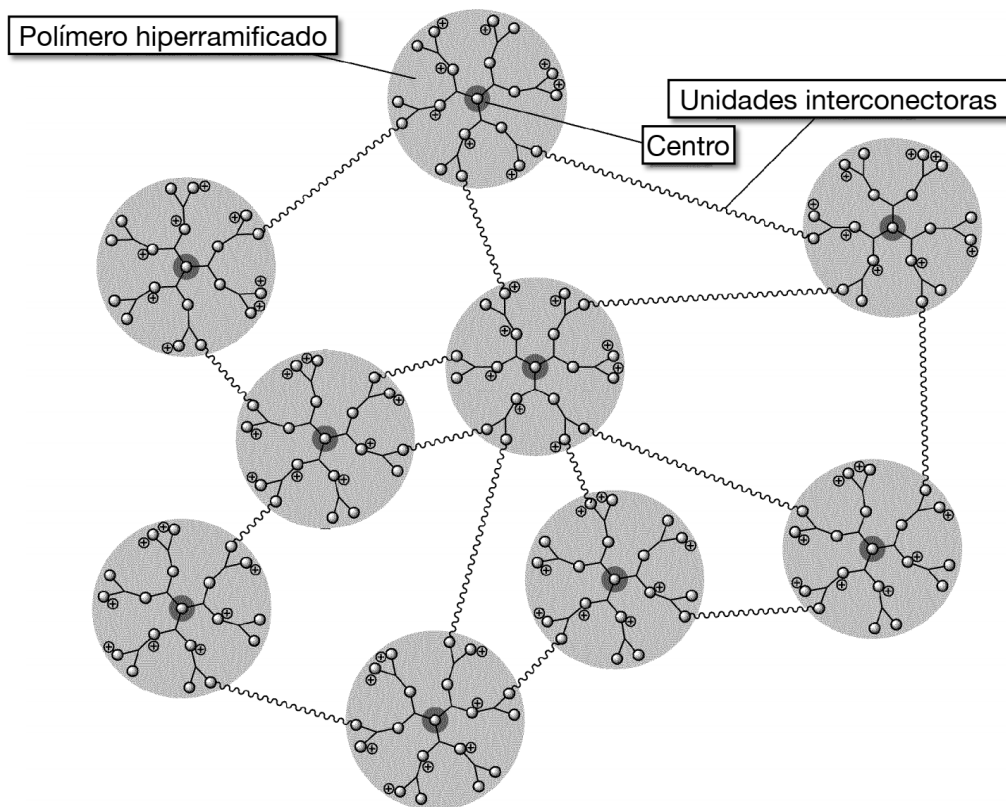


Figura 6

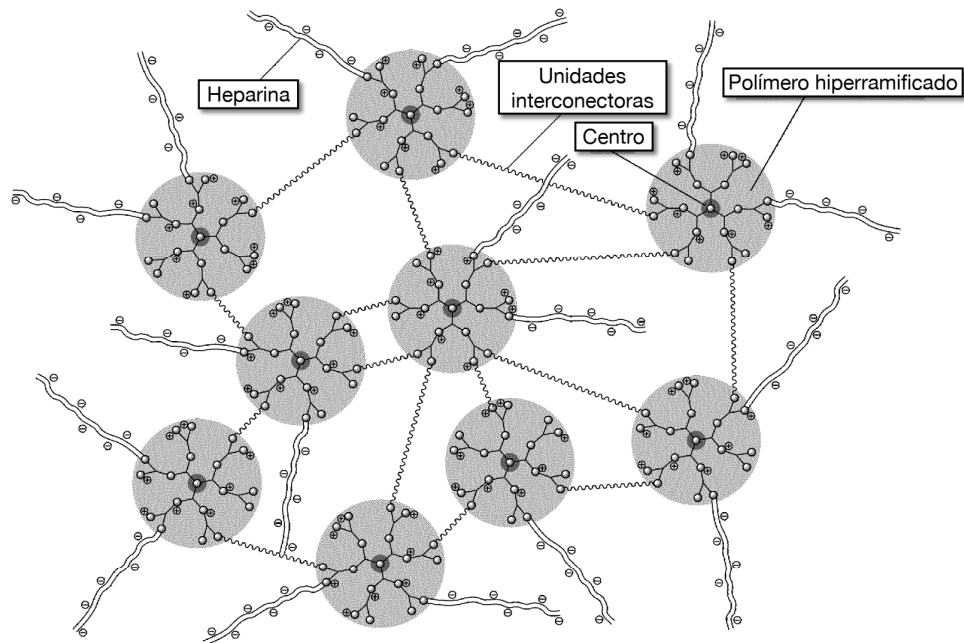


Figura 7

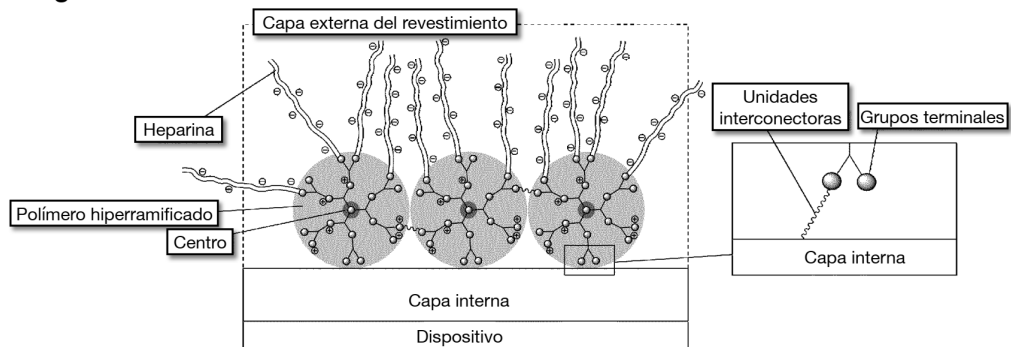


Figura 8

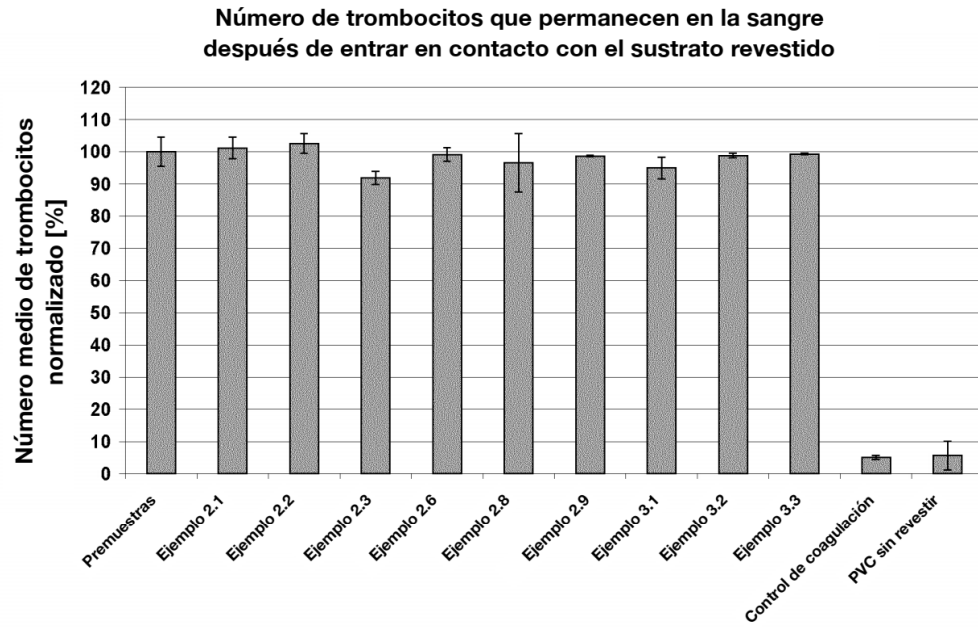


Figura 9

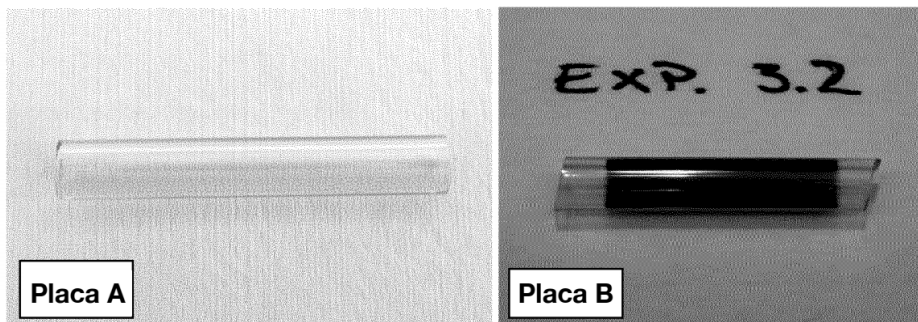


Figura 10

