

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 924**

51 Int. Cl.:

A61L 27/44 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 33/10 (2006.01)
A61L 33/16 (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01)
A61L 33/00 (2006.01)
A61B 17/12 (2006.01)
A61B 17/00 (2006.01)
B05D 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2015 PCT/AU2015/050539**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16037239**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2015 E 15840462 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3191148**

54 Título: **Dispositivos médicos con trombogenicidad reducida**

30 Prioridad:

12.09.2014 US 201462049879 P

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

02.10.2020

73 Titular/es:

**HEART RESEARCH INSTITUTE LTD. (100.0%)
7 Eliza Street
Newtown, New South Wales 2042, AU**

72 Inventor/es:

**WISE, STEVEN G. y
NG, MARTIN K. C.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 784 924 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

Dispositivos médicos con trombogenicidad reducida

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere, en general, a biomateriales con compatibilidad sanguínea mejorada, creados mediante la inmovilización de proteínas, tal como enzimas sanguíneas, para reducir la trombogenicidad superficial, utilizando la activación plasmática del sustrato para llevar a cabo la fijación.

10

Antecedentes de la invención

A pesar de la creciente incidencia de enfermedades cardiovasculares, actualmente hay pocos biomateriales efectivos disponibles para aplicaciones vasculares clínicas. Los biomateriales sintéticos disponibles en la actualidad, como el tereftalato de polietileno, presentan un abanico de aplicaciones vasculares que incluyen el injerto endovascular, la sustitución de la válvula cardíaca, parches vasculares/miocárdicos y dispositivos de cierre vascular, pero funcionan mal como conductos quirúrgicos vasculares.

15

Un número cada vez mayor de dispositivos implantables utilizados en la reparación cardiovascular, incluyendo válvulas cardíacas y endoprótesis vasculares, están hechos con aleaciones metálicas (Singh *et al.*, J. Mat. Sci. Etera. Med. 18:725 (2007)). Las superficies metálicas son inherentemente trombogénicas, una propiedad que actualmente se disimula con una significativa reducción farmacológica de las plaquetas. Tras el despliegue de una endoprótesis, los índices reducidos (1-2 %) de trombosis incipiente solo se mantienen si se cumple con el tratamiento antiagregante plaquetario doble (TAPD) con aspirina y tienopiridina (Urban *et al.*, Lancet. 369:619 (2007)). En la época de las endoprótesis farmacoactivas (EFA), la duración adecuada de TAPD sigue sin estar clara, pero se reconoce cada vez más que depende de la plataforma de la endoprótesis. Los últimos datos clínicos demuestran que las EFA que liberan zotarolimus de segunda generación continúan suponiendo un riesgo continuo de trombosis de hasta un 0,6 % al año, y que aumenta drásticamente hasta el 3,6 % si se suspende el TAPD en el primer mes. A este problema se le agrega el del TAPD, que conlleva un riesgo inherente de hemorragia y que aumenta significativamente si el tratamiento continúa durante 12 meses o más (Valgimigli *et al.*, Circulation, 125:2015 (2012)). Una plataforma de endoprótesis con hemocompatibilidad mejorada proporcionaría beneficios evidentes.

20

25

30

La eliminación de la fibrina y la lisis de los coágulos sanguíneos, denominada fibrinólisis, comprende principalmente plasminógeno. Varios factores de activación, incluyendo el activador tisular del plasminógeno (tPA), descompone el plasminógeno en su forma activa, la plasmina (Marder *et al.*, Stroke J. Cereb. Circ. 41:S45 (2010)). La plasmina es una enzima proteolítica de dos cadenas y de 90 kDa, capaz de degradar múltiples proteínas tanto en el plasma como en el espacio extracelular, pero, en particular, la fibrina. Para aplicaciones materiales, ha despertado un gran interés la adaptación de esta vía para generar superficies de lisis de coágulos (Li *et al.*, Coloides Surf. B biointerfaces, 86:1 (2011)). Un enfoque ha sido exponer superficies ricas en lisina al plasma, aislando preferentemente el plasminógeno para una mayor activación. *In vitro*, este método ha demostrado la lisis de coágulos en sustratos de poliuretano y cobalto-cromo (Chen *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. A., 90:940 (2009); Wang *et al.*, J. Biomater. Sci. Poly., Ed., 24:684 (2013)). Como alternativa, ha demostrado ser prometedora la inmovilización directa de reguladores endógenos de la formación de trombos, como la trombomodulina o tPA en superficies de biomateriales, aunque se necesitan una serie de productos químicos intermedios fijados a una interfaz de poliuretano para la fijación (Qu *et al.*, Adv. Cuidado de la salud Mat., 3:30 (2014); Wu *et al.*, Acta Biomater. 7:1993 (2011)).

35

40

45

Este trabajo pone de manifiesto desafíos importantes en la adaptación de las sustancias fibrinolíticas para mejorar la hemocompatibilidad de biomateriales, incluyendo la necesidad de disponer de esquemas químicos de conectores complejos para una fijación resistente y la retención a largo plazo de sustratos biológicamente activos. La adaptación a plataformas metálicas inertes con geometrías tridimensionales variadas, como las endoprótesis, acentúa aún más estas dificultades.

50

Un objetivo de la presente invención es proporcionar materiales que sean adecuados para su aplicación vascular, que sean biocompatibles y no trombogénicos o que tengan una trombogenicidad muy baja, y un método para fijarlos de manera segura a sustratos médicos sin alterar o disminuir la actividad.

55

La patente de Estados Unidos n.º 8.808.365 (Ng *et al.*), el documento WO 2009/015420 (The University of Sydney), el documento WO 2012/174596 (The University of Sydney) y el documento US 2003/0113478 (Dang *et al.*) divulgan dispositivos médicos con superficies polimerizadas con plasma, en algunos casos, además, tienen un recubrimiento antitrombogénico.

60

Sumario de la invención

La presente invención es la que se define en las reivindicaciones, en concreto, un dispositivo médico vascular que comprende una superficie, que consiste en un polihexano o poliacetileno biocompatible polimerizado con plasma que

65

tiene nitrógeno incorporado en su interior sobre un sustrato metálico, cerámico, de carbono o polimérico del dispositivo, que entra en contacto con la sangre, en donde la superficie está recubierta con plasmina que está unida covalentemente a esta. La invención también se refiere a un método para fabricar un dispositivo médico vascular, que comprende a) polihexano o poliacetileno polimerizado con plasma en nitrógeno o una mezcla de argón y nitrógeno para formar un polihexano o poliacetileno que tiene nitrógeno incorporado en su interior, sobre una superficie o componente de polímero, metal, cerámica o carbono del dispositivo, que entra en contacto con la sangre, y b) unir covalentemente la plasmina al polihexano o poliacetileno polimerizado para recubrir la superficie o componente del dispositivo que entra en contacto con la sangre. Aunque en el presente documento se divulguen otros dispositivos médicos vasculares y métodos para producirlos, solo se incluyen con fines de referencia.

Un proceso de recubrimiento activado con plasma (PAC, por sus siglas en inglés) une covalentemente las enzimas en su estado bioactivo, presenta una trombogenicidad reducida y se puede aplicar firmemente en dispositivos médicos, resistiendo la deslaminación cuando se despliega *in vivo*. La aplicación de este proceso en la fijación de proteínas, como las enzimas que inhiben la trombosis, y anticoagulantes, como la heparina o fragmentos de heparina, se pueden producir dispositivos médicos y otros materiales para su uso en aplicaciones vasculares que tienen una serie de beneficios, que incluyen:

- 1) fijación covalente, no requiere conectores intermedios ni química: incubación simple únicamente con PAC;
- 2) sustrato independiente: funciona sobre polímeros, metales, cerámicas, formas en 3D como las endoprótesis, válvulas, etc.;
- 3) se conserva la bioactividad;
- 4) la superficie puede conservar una mayor bioactividad *in vivo* a lo largo del tiempo;
- 5) permite la endotelialización de manera simultánea;
- 6) se puede almacenar durante largos períodos, después de la liofilización, y conserva la eficacia cuando se rehidrata y;
- 7) la superficie es capaz de unir muchas enzimas fibrinolíticas como la estreptoquinasa, urocinasa, tPA, plasmina).

El proceso con plasma contiene nitrógeno y acetileno, y deposita significativamente una película a base de carbono activado sobre el sustrato que facilita la fijación covalente de biomoléculas. A diferencia de otros métodos, que se basan en la liberación de activos en combinación con materiales inertes.

Las enzimas preferidas incluyen estreptoquinasa, urocinasa, activador tisular del plasminógeno (tPA) y plasmina. También se pueden inmovilizar sobre sustratos metálicos o poliméricos otros materiales, como la heparina y los fragmentos de heparina.

Los componentes de las endoprótesis endovasculares, las válvulas cardíacas y los dispositivos de ritmo cardíaco se fabrican con aleaciones metálicas. En estas aplicaciones de contacto con la sangre, todos los dispositivos metálicos presentan altos índices de trombosis que son tratados clínica y únicamente con una reducción significativa de plaquetas. En una realización preferente, los materiales artificiales forman una endoprótesis que tiene una trombogenicidad reducida y una mayor endotelización debido a un proceso PAC que permite la inmovilización de una proteína no trombogénica en la endoprótesis. La tecnología es útil para muchos otros implantes y dispositivos, incluyendo válvulas cardíacas, mallas vasculares, máquinas de derivación cardiopulmonar, bombas implantables y válvulas implantables.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un esquema que muestra las etapas o fases de la inmovilización de plasmina. En ausencia de modificación (etapa 1), el acero inoxidable recluta plaquetas y eritrocitos y activa la fibrina (etapa 2), lo que produce la formación de coágulos (etapa 3). Después de la activación de la superficie con el proceso PAC (etapa 4), la plasmina puede quedar retenida de manera covalente (etapa 5) y puede prevenir la formación de redes de fibrina, oponiéndose a la formación de coágulos (etapa 6).

La figura 2A es un gráfico que muestra la composición elemental del PAC con el paso del tiempo, medida por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). El contenido relativo de oxígeno permanece estable, mientras que los aumentos marginales del carbono se compensan con nitrógeno reducido.

La figura 2B es un gráfico que muestra que el ángulo de contacto con el agua del PAC se estabiliza a aproximadamente 62°, lo que indica una interfaz ligeramente hidrófoba.

La figura 2C es un gráfico que muestra espectros de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de la plasmina recubierta sobre acero inoxidable (AI) y PAC, antes y después del lavado SDS en cada caso.

La figura 2D es un gráfico que muestra que el cálculo de los picos de amida infiere en la retención covalente de la plasmina en el PAC, al contrario que la eliminación completa sobre acero inoxidable.

La figura 3A es un gráfico de una prueba de la actividad del D-Val-Leu-Lys-p-Nitroanilida (VALY), que muestra la descomposición creciente del sustrato con el paso del tiempo por la plasmina libre en solución. Cuando estaba unida al PAC, la plasmina se mantuvo activa, lo que también muestra una mayor absorbancia con el tiempo. No se observó señal del PAC solo.

La figura 3B es un gráfico que muestra la proliferación de células endoteliales sobre el plástico de cultivo para tejidos (TCP) no recubierto, en comparación con el TCP recubierto con plasmina o fibronectina (FN). Las superficies recubiertas de plasmina admiten un aumento del número de células endoteliales de 3 a 5 días, más que solo con el TCP.

5 La figura 3C es un gráfico que muestra que cuando se inmoviliza sobre el PAC, la plasmina admite la endotelización hasta 5 días, igual que la FN.

La figura 4 es un gráfico que demuestra la trombogenicidad relativa del AI, del PAC solo y de la plasmina unida covalentemente al PAC mediante una prueba de adhesión de la sangre total. Las concentraciones crecientes de plasmina, 0,1 U, 1,0 U y 10 U, inmovilizada en el PAC, demostraron una reducción drástica del peso del trombo de una manera que dependía de la dosis, en comparación con los controles de AI. El PAC solo redujo el peso del trombo 45,4±9,1 %, pero se observaron reducciones adicionales de la plasmina 0,1 U (62,3±6,4 %), 1 U (78,3±6,4 %) y 10 U (90,5±1,3 %), con respecto al AI ($p<0,001$).

10 Las figuras 5A-5D son gráficos que evalúan directamente la contribución de la plasmina unida a la superficie, después de la desnaturalización de la enzima antes de la incubación con el PAC. Tras repetir ciclos de congelación-descongelación, se confirmó que la plasmina estaba inactiva usando la conversión VALY descrita anteriormente (figura 5A). Las superficies unidas a la plasmina desnaturalizada continuaron siendo superiores frente al AI, pero fueron estadísticamente equivalentes a las superficies de solo PAC y presentaron pesos de coágulo significativamente mayores que la plasmina fresca sobre el PAC (figura 5B). Teniendo en cuenta el potencial para almacenar superficies de PAC recubiertas con plasmina, las muestras se liofilizaron antes de la rehidratación y se volvieron a analizar con sangre total. Inmediatamente después de la liofilización (figura 5C) y hasta 14 semanas después (figura 5D), los pesos del coágulo de plasmina recién preparada y almacenada sobre PAC fueron equivalentes.

25 La plasmina se desnaturalizó en autoclave antes de la inmovilización sobre el PAC, lo que produjo una pérdida completa de la actividad de la prueba con VALY (figura 5A). La plasmina desnaturalizada no pudo reducir la formación de trombos más allá del efecto del PAC solo, y el peso del coágulo fue significativamente mayor que el resultante de la plasmina recién preparada (figura 5B). La compatibilidad sanguínea de 10 U de plasmina se conservó después de la liofilización y la rehidratación inmediata (figura 5C); así como después de 14 semanas de almacenamiento a 4 °C antes de la rehidratación (figura 5D).

30 La figura 6A ilustra las etapas de una prueba con un Chandler Loop modificado, que muestran que, en condiciones de flujo, las muestras de acero inoxidable produjeron una importante formación de trombos. La figura 6B es un gráfico que muestra que la superficie de plasmina de 10 U redujo el peso del coágulo en 97,97±1,3 %, con respecto al acero inoxidable y el PAC solo ($p<0,001$). En condiciones de flujo en un Chandler Loop modificado (figura 6A), las muestras de acero inoxidable ("AI") produjeron una importante formación de trombos (61,8±8,3 mg, figura 6B). En cambio, la trombogenicidad del PAC solo se redujo significativamente a 15,8±1,1 mg ($p<0,001$), mientras que la inmovilización de 10 U de plasmina sobre el PAC redujo aún más el peso del coágulo a 1,4±0,4 mg ($p<0,001$), una reducción de 97,7±1,3 % en relación con los controles de AI. La figura 6C es un gráfico de la sP-Selectina (ng/ml) con respecto al AI, el PAC, sin implante y 10 U de plasmina inmovilizada sobre el PAC.

40

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

45 El término "prueba", como se usa en el presente documento, se refiere al procedimiento analítico para evaluar cualitativamente o medir cuantitativamente la presencia o cantidad o la actividad funcional de una entidad diana (el analito).

50 La expresión "prueba con Chandler Loop", como se usa en el presente documento, se refiere a un sistema de tubos rotatorios que simula la circulación de la sangre. Esta prueba es la conveniente para analizar la hemocompatibilidad de dispositivos médicos instalados en el torrente sanguíneo.

55 El término "coagulación" o "coagulación de la sangre", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso por el cual la sangre cambia de líquida a gelatinosa. Esto, potencialmente, produce hemostasia, el cese de la pérdida de sangre de un vaso dañado, y después, su reparación.

El término "recubrimiento" o "recubierto", como se usa en el presente documento, se refiere a la capa funcional de material que se aplica a la superficie de un objeto, normalmente denominado sustrato.

60 El término "unión covalente", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión química que se forma como resultado del equilibrio estable de las fuerzas de atracción y repulsión entre átomos cuando comparten electrones.

65 El término "células endoteliales", como se usa en el presente documento, se refiere a las células que revisten los vasos sanguíneos.

El término "enzima", como se usa en el presente documento, se refiere a un catalizador biológico que facilita un proceso metabólico.

5 El término "fibrina", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína fibrosa no globular involucrada en la coagulación de la sangre. Se forma por la acción de la proteasa trombina sobre el fibrinógeno, lo que hace que este último se polimerice. La fibrina polimerizada junto con las plaquetas forma un tapón hemostático o coágulo sobre el sitio de la herida.

10 El término "fibrinólisis", como se usa en el presente documento, se refiere a la degradación de la fibrina.

El término "fibrinolítico", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una sustancia para degradar la fibrina y, por lo tanto, evitar que los coágulos sanguíneos crezcan y se vuelvan problemáticos.

15 El término "liofilizado" o "criodesecado", como se usa en el presente documento, se refiere a los materiales que se deshidratan con fines de conservación.

El término "hemocompatible" se refiere a un conjunto de propiedades que permiten el contacto con el flujo sanguíneo sin provocar reacciones adversas como la trombosis, hemólisis, activación del complemento o inflamación.

20 El término "inmovilización", como se usa en el presente documento, se refiere a la fijación de una sustancia a un material inerte e insoluble, permitiendo una mayor resistencia a los cambios de las condiciones como el pH o la temperatura. En particular, permite que las enzimas se mantengan en su lugar durante una reacción, facilitando así su reutilización.

25 El término "mediador", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que participa en un proceso físico, químico o biológico, tal como en un recubrimiento que facilita la inmovilización de enzimas en un sustrato.

30 El término "no trombogénico", como se usa en el presente documento, se refiere a la tendencia que tiene un material en contacto con la sangre de prevenir la formación de un trombo o coágulo.

La expresión "recubrimiento activado con plasma" o "PAC", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso de inmovilización de la plasmina sobre sustratos de acero inoxidable usando un mediador de recubrimiento activado con plasma para crear una superficie que atenúe sustancialmente la formación de trombos.

35 El término "plasmina", como se usa en el presente documento, se refiere a la enzima presente en la sangre que degrada muchas proteínas del plasma sanguíneo, incluyendo coágulos de fibrina.

40 El término "plasminógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a la glucoproteína que circula en la sangre precursora de la plasmina.

El término "plaquetas" o "trombocitos", como se usa en el presente documento, se refiere a las células sanguíneas cuya función es detener las hemorragias. Las plaquetas no tienen núcleo, son fragmentos de citoplasma que se obtienen de los megacariocitos de la médula ósea y, después, pasan a la circulación.

45 La expresión "reducido/a", como se usa en el presente documento, se refiere a que algo se ha hecho más pequeño o que hay menos cantidad, medida o tamaño.

50 El término "endoprótesis", como se usa en el presente documento, se refiere a un tubo de malla que se inserta en un canal o conducto natural del cuerpo para prevenir o contrarrestar un estrechamiento localizado del flujo inducido por una enfermedad.

El término "estreptoquinasa", como se usa en el presente documento, se refiere a la enzima secretada por varias especies de estreptococos que pueden unirse y activar el plasminógeno humano.

55 El término "sustrato", como se usa en el presente documento, se refiere al material que subyace el mediador y la proteína no trombogénica.

60 El término "trombina", como se usa en el presente documento, se refiere a la serina proteasa que convierte el fibrinógeno soluble en hebras insolubles de fibrina, y que cataliza muchas otras reacciones relacionadas con la coagulación.

El término "trombogenicidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la tendencia de un material en contacto con la sangre de producir un trombo o coágulo.

65 El término "trombosis", como se usa en el presente documento, se refiere a la formación de un coágulo de sangre

dentro de un vaso sanguíneo que obstruye el flujo de sangre a través del sistema circulatorio.

5 El término "trombo" o "coágulo de sangre", como se usa en el presente documento, se refiere a una masa sólida o semisólida formada a partir de los constituyentes de la sangre dentro del sistema vascular que es el producto de coagulación de la sangre. En un trombo existen dos componentes, las plaquetas acumuladas que forman un tapón de plaquetas y una malla de proteína fibrina reticulada.

10 La expresión "activador de plasminógeno tisular" o "tPA", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína involucrada en la lisis de los coágulos sanguíneos. Es una serina proteasa que se encuentra en las células endoteliales. Como enzima, cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina, la enzima principal responsable de la lisis de los coágulos.

15 El término "uroquinasa", como se usa en el presente documento, se refiere a la serina proteasa que está presente en el torrente sanguíneo y que actúa sobre el plasminógeno.

El término "válvula", como se usa en el presente documento, se refiere a un dispositivo que controla el paso de fluido a través de una tubería o conducto, permitiendo el movimiento en una sola dirección.

20 Las siglas "VALY", como se usan en el presente documento, se refieren al sustrato de plasmina D-Val-Leu-Lys-p-Nitroanilida.

La expresión "prueba de actividad VALY", como se usa en el presente documento, se refiere a una prueba que mide la descomposición del VALY por la plasmina en p-Nitroanilida y D-Val-Leu-Lys.

25 El término "cimógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un precursor enzimático inactivo que requiere un cambio bioquímico para convertirse en una enzima activa.

II. Composiciones

30 Se ha descubierto que la polimerización con plasma de un sustrato puede mejorar enormemente la biocompatibilidad, que se potencia aún más mediante el acoplamiento de enzimas y otros antitrombóticos, como la heparina, que inhiben la coagulación y la activación plaquetaria. En el presente documento, estos se denominan colectivamente "antitrombóticos". El recubrimiento antitrombótico es lo suficientemente resistente como para soportar el despliegue y el flujo sanguíneo y presenta el antitrombótico en una forma biológicamente activa, disminuyendo así la trombogenicidad.

A. Polimerización con plasma procesada en sustrato

40 La enzima se une covalentemente a sustratos metálicos a través de un intermediario polimérico, como el acetileno (etileno). La capa de acetileno se mezcla con la superficie metálica mediante polimerización con plasma, convirtiendo la superficie de metal inerte en una superficie de polímero reactiva. La composición de la capa de polímero puede variar mucho y las condiciones para una unión antitrombótica óptima también. Se pueden lograr resultados similares utilizando otras cadenas de carbono (como el hexano) o diferentes condiciones plasmáticas.

45 La figura 1 es un esquema que muestra las etapas o fases de la inmovilización de plasmina. En ausencia de modificación (etapa 1), el acero inoxidable recluta plaquetas y eritrocitos y activa la fibrina (etapa 2), lo que produce la formación de coágulos (etapa 3). Después de la activación de la superficie con el proceso PAC (etapa 4), la plasmina puede quedar retenida de manera covalente (etapa 5) y puede prevenir la formación de redes de fibrina, oponiéndose a la formación de coágulos (etapa 6).

50 Dado los problemas actuales con respecto a las últimas trombosis de endoprótesis con endoprótesis farmacoactivas, muchos grupos están explorando el uso de recubrimientos biodegradables para la liberación de fármacos. En tales casos, se puede aplicar un recubrimiento farmacoactivo biodegradable sobre un recubrimiento biocompatible, tal como enzima unida covalentemente por polimerización con plasma. Esto permitiría la elución local de un fármaco, dejando una endoprótesis con un recubrimiento biocompatible.

60 Las endoprótesis también se pueden fabricar con materiales degradables como alternativa a las estructuras metálicas permanentes. Estas endoprótesis bioreabsorbibles se han fabricado habitualmente a partir de polímeros, como el ácido poliláctico y el ácido poliglicólico, que permanecen en el cuerpo durante 6-24 meses (Zilberman y Eberhard, *Ann. Rev. Biomed. Ing.*, 8:153-180 (2006)). Las endoprótesis bioreabsorbibles también pueden fabricarse con aleaciones metálicas como el magnesio. Estas se reabsorben completamente en 2 meses y han demostrado resultados clínicos prometedores (Erbel, Di Mario, *et al.*, *Lancet*. 369:1869-75 (2007)). La polimerización con plasma y/o el recubrimiento con enzimas también es relevante para la mejora de la biocompatibilidad a corto plazo de estas estructuras temporales y podrían adaptarse fácilmente para su modificación.

65 Los materiales que pueden ser polimerizados con plasma incluyen metales, polímeros, carbono y cerámica. El

antitrombótico se puede aplicar en, reticularse con, fijarse a mezclase con o laminarse como parte de uno o más materiales para formar una superficie, componente o dispositivo. En la realización preferida, un polímero gradual, como la capa de acetileno, se deposita en la superficie de un metal, de modo que la deposición inicial es metal, aumentando la cantidad de polímero, acabando con un 100 % de polímero. El efecto de esta capa gradual es que no hay una interfaz de metal/polímero definida y no se desprende el recubrimiento. La capa de polímero se activa químicamente usando tratamiento con plasma de gas, predisponiéndolo para formar uniones covalentes con antitrombóticos. La inmersión de la superficie polimerizada con plasma en una solución antitrombótica es suficiente para la fijación covalente, sin necesitar una sustancia de reticulación distinta. Es importante destacar que se conserva la bioactividad.

Los metales habituales incluyen acero inoxidable y titanio. En una realización, el material es o incluye uno o más polímeros sintéticos biodegradables o no biodegradables como las polilactidas, ácidos poliglicólicos, policaprolactonas, policaprolactamas, polihexametilenadipamida, policarbonatos, poliamidas, polianhídridos, poliaminoácidos, poliésteres, poliacetales, policianoacrilatos, alcoholes de polivinilo, cloruros de polivinilo, polietilenos, poliuretanos, polipropilenos, poliácridatos, poliestirenos, óxidos de polivinilo, fluoruros de polivinilo, poli(vinilimidazoles), óxidos de polietileno, politetrafluoroetilenos, polímeros y copolímeros de silicona y combinaciones de estos. En otra realización, el material es o incluye uno o más materiales naturales como una proteína, azúcar o polisacárido, o una combinación de estos. Los ejemplos representativos incluyen colágeno, preferentemente de tipo 1 y/o de tipo 3, fibrina, gelatina, vitronectina, fibronectina, laminina, ácido hialurónico, glucosaminoglicanos, sus derivados y mezclas de estas. Los glicosaminoglicanos preferidos incluyen sulfato de condroitina, dermatán sulfato, queratán sulfato, heparán sulfato, heparina e hialuronano.

La aplicación determinará la selección y el diseño de las propiedades mecánicas. El material se puede aplicar como parte de varias aplicaciones vasculares clínicas que incluyen un conducto vascular, una endoprótesis, un injerto-endoprótesis, una válvula cardíaca implantable quirúrgica o percutáneamente, un dispositivo de oclusión vascular/septal, un dispositivo de cierre vascular, un implante endovascular, un injerto con endoprótesis, un injerto, un oclisor vascular de cables de marcapasos, un dispositivo de oclusión de la orejuela auricular izquierda, una válvula endovascular, dispositivos de cierre vascular, que incluyen el cierre de la comunicación interauricular y del agujero oval permeable, o filtros de vena cava, o como un recubrimiento superficial para un dispositivo/aplicación vascular.

La proteína también se puede utilizar para formar recubrimientos sobre materiales como microchips, que pueden estar formados por un material, como un chip de silicio, que pueden usarse como sensores, electrodos, o para la administración de fármacos, o un dispositivo como una bomba implantable.

Otros materiales útiles son matrices para ingeniería de tejidos y/o administración de fármacos, implantes óseos y prótesis que incluyen clavos, clavijas, tornillos y varillas, así como rodillas artificiales y otras articulaciones, especialmente en las superficies donde el metal, la cerámica o el hueso hace contacto con el tejido del receptor. En la mayoría de estos casos, el papel fundamental de la enzima es aumentar la biocompatibilidad del implante o matriz, fomentando la fijación celular o disminuyendo la formación de tejido cicatricial, la proliferación anómala de células (es decir, reestenosis o deformidades cicatriciales) e integración del implante en el huésped.

B. Sustancias antitrombóticas

La sustancia antitrombótica se une covalentemente por la plasmina a la superficie.

III. Métodos de fabricación de materiales y dispositivos

Un proceso de recubrimiento activado con plasma (PAC) une de forma covalente a las biomoléculas en su estado bioactivo, presenta una trombogenicidad reducida y se puede aplicar firmemente en dispositivos médicos, resistiendo la deslaminación cuando se despliega *in vivo* (Yin *et al.*, *Biomaterials*, 30:1675 (2009); Waterhouse *et al.*, *Biomaterials*, 31:8332 (2010); Waterhouse *et al.*, *Biomaterials*, 33:7984 (2012)).

El material del sustrato se modifica para crear grupos de superficie reactivos que faciliten la interacción covalente. En el caso de materiales poliméricos inertes como ePTFE, la superficie requiere activación. Se pueden utilizar ambos procesos plasmáticos "clásicos" (Bilek *et al.* (2004) en *Smart Materials III*, Vol. 5648 (Ed, Wilson AR) SPIE, pp. 62-67) y la implantación iónica por inmersión en plasma de mayor energía (Bilek, *et al.* *Surface and Coatings Technology*, 156: 136-142 (2002)) (PIII).

En una realización preferida, la enzima se fija covalentemente al polímero cuando una solución de la proteína se incubaba con la superficie activada. Recientemente se ha demostrado que la PIII aumenta la duración funcional de las proteínas unidas y puede ser la conveniente (Nosworthy, *et al.* *Acta Biomater*, 3:695-704 (2007)).

Los sustratos metálicos también se pueden funcionalizar aplicando un proceso con plasma modificado en el sustrato mientras se sumerge en un plasma que contiene carbono o en un vapor del monómero utilizado para depositar la capa de polímero de plasma, o por deposición conjunta de una capa de sustrato/polímero gradual que termina en el

polímero (Yin, *et al.*, Navegar. Saco. Technol., 203:1310-1316 (2009)). Se puede utilizar una gama de polímeros a base de carbono de cadena corta que incluyen hexano y acetileno para formar la base de la capa de polímero de plasma. La cámara de plasma también contiene un gas portador de fondo, cuyos ejemplos incluyen oxígeno, hidrógeno, argón, nitrógeno y combinaciones de estos. Esta mezcla de plasma es esencial para la eficacia.

En una realización preferida, se inyecta acetileno en la cámara de plasma y se activa junto con una combinación de nitrógeno y gas de fondo argón, condensándolo después para formar superficies polimerizadas. Esta técnica se puede utilizar para unir enzimas a varios metales, incluido el acero inoxidable, como han demostrado Yin *et al.*, Biomaterials, 30:1675-1681 (2009).

. La presente invención se entenderá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Inmovilización covalente de la plasmina en el PAC.

Materiales y métodos

Reactivos: Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, St. Louis y se utilizaron sin purificación adicional a menos que se indique lo contrario. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron enzimáticamente de cordones umbilicales. Se utilizaron células endoteliales de los conductos 2-4.

Preparación de la muestra: Los sustratos eran láminas de acero inoxidable (Al) tipo 316L de 25 μm de espesor (Brown Metals) o endoprótesis de acero inoxidable 316LVM de 3,0x10 mm (Lasera, California, EE. UU.). El revestimiento activado con plasma (PAC) sobre superficies de acero inoxidable 316L se generó a partir de acetileno en argón mezclado con nitrógeno. Se obtuvieron imágenes de las endoprótesis de acero inoxidable con un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO 50. Las muestras se incubaron con concentraciones crecientes de plasmina (0,1; 1,0 y 10 μg) en PBS a 37°C durante la noche y se lavaron en PBS antes de su uso.

Caracterización de superficie: El ángulo de contacto entre el PAC y el agua desionizada se midió usando un analizador de ángulo de contacto Kruss DS10 que emplea el método de gota sésil. Se utilizó la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS, Specs-XPS, ánodo gemelo de alto rendimiento modo XP-50 con monocromador de cristal elipsoidal Focus 500 y analizador PHOIBOS 150 MCD-9) para proporcionar datos sobre la composición elemental de las variantes de PAC a lo largo del tiempo. El *software* CASA XPS se utilizó para calcular las áreas de picos elementales con la concentración de cada elemento expresada como porcentaje atómico.

Resultados

Como se muestra en la figura 2A, el porcentaje relativo de nitrógeno en la superficie disminuyó de 32,3 \pm 1,0 % en el día 1, a 24,2 \pm 0,5 % en el día 23. Este correspondió a un pequeño aumento en el oxígeno de 7,1 \pm 0,5 % a 8,2 \pm 0,3 % y en el contenido relativo de carbono de 60,6 \pm 1,7 % a 67,6 \pm 1,1 % del día 1 al 23, respectivamente. El ángulo de contacto inicial del PAC con el agua fue de 42,9 \pm 2,4° 30 minutos después del tratamiento, aumentando a 52,9 \pm 1,0° después de 2 horas (figura 2B). La química de la superficie parecía haberse estabilizado en el día 7, cuando se observó que el ángulo de contacto con el agua era 61,6 \pm 0,4°. Solo se observaron cambios menores a partir de este momento hasta los 24 días.

Los espectros de las superficies de PAC y Al después de la incubación con plasmina contenían picos característicos asociados con las vibraciones proteicas internas y confirmaron la presencia de una capa polimérica reticulada que contenía predominantemente carbono y nitrógeno, con terminaciones de hidrógeno y oxígeno (figura 2C). Se observan vibraciones de unión atribuidas a las uniones C-C y C-N tanto saturadas como insaturadas. Las absorciones de C-H, O-H y N-H indican que las terminaciones de hidrógeno están presentes y que la superficie se ha oxidado por exposición a la atmósfera. Las intensidades relativas de los picos de FTIR característicos de la amida I, II y III para la plasmina se compararon antes y después del lavado con detergente (figura 2D). Después del lavado con detergente, las superficies solo mostraron plasmina unida covalentemente, con una retención de 54,2 \pm 3,8% de plasmina unida originalmente sobre el PAC, pero con una completa eliminación del acero inoxidable.

Ejemplo 2. La plasmina unida covalentemente conserva la bioactividad.

Materiales y métodos

Fijación covalente: Las muestras se lavaron con agua Milli-Q para eliminar la sal y se secaron antes de la acumulación de espectros usando un espectrómetro de FTIR Digilab FTS7000 equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR) con un cristal de germanio trapezoidal en un ángulo de incidencia de 45°. Para obtener suficiente relación señal/ruido y resolución de bandas espectrales, se obtuvieron 500 barridos con una resolución de 1 cm^{-1} . Los espectros de diferencia se usaron para detectar cambios asociados con la presencia de la plasmina, y se llevó a cabo el análisis. La proteína no unida se eliminó por aspiración y las superficies se lavaron con

PBS. La proteína unida no covalentemente se eliminó mediante lavado con SDS. Las muestras se trataron con SDS al 5 % (p/v) durante 1 hora a 80°C. Después del tratamiento con SDS, las muestras se lavaron con PBS y agua destilada.

- 5 *Ensayo de bioactividad:* La actividad enzimática de la plasmina se monitorizó usando un kit comercialmente disponible. Una unidad de actividad se define como la producción de un micromol de p-Nitroanilida a partir de D-Val-Leu-Lys-p-Nitroanilida (VALY) a un pH de 7,5 a 37°C. La actividad se monitorizó en el tiempo, hasta los 210 minutos, y comparó la plasmina libre en solución con la plasmina inmovilizada sobre el PAC y el PAC solo como control negativo.

10

Resultados

Se midió el cambio de color que ocurre cuando el VALY se convierte en p-Nitroanilida a 405 nm para monitorizar la actividad enzimática de la plasmina. Tanto la plasmina fresca en solución como la plasmina inmovilizada sobre el PAC pudieron convertir el sustrato, mostrando una mayor absorbancia con el tiempo, hasta los 290 minutos (figura 3A). El PAC solo no produjo p-Nitroanilida.

15

Ejemplo 3: Efecto sobre la fijación celular y la proliferación

20 Materiales y métodos

Interacciones de células endoteliales: Para las pruebas de proliferación, las HUVEC (20.000 células/ml) se colocaron en placas de 24 pocillos durante 3 y 5 días. Se analizaron la fijación y proliferación de células a y sobre los pozos recubiertos con plasmina en comparación con el plástico de cultivo para tejidos solo y con los pozos recubiertos con fibronectina (10 µg/pocillo). Las células se cuantificaron a los 3 y 5 días después de la siembra usando la prueba MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) según las instrucciones del fabricante. Se usó dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver cristales de formazán insolubles, y se midió la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro (Biorad).

25

30 Resultados

Después de 3 días de incubación, el número de células sobre el TCP, la plasmina y la fibronectina (FN) no fueron significativamente diferentes (figura 3B). En el día 5, la proliferación celular sobre la plasmina fue de 56,40±3,2 % más que el TCP solo (p<0,001), pero permaneció estáticamente inferior que el control positivo de FN, que fue un 22,12±1,8 % más alto que la plasmina (p<0,01). Cuando se inmovilizó sobre el PAC, no hubo de nuevo diferencia significativa entre las condiciones en el día 3 (figura 3C). En el día 5, PAC y PAC+plasmina mostraron un aumento de 20,47±1,6 % y 31,16±2,4 % sobre el acero inoxidable (AI) respectivamente, aunque no se consiguió importancia estadística. El PAC+FN aumentó la proliferación de las HUVEC 53,49±2,8 % (p<0,01) sobre acero inoxidable, aunque solo fue de un 17,02±1,2 % más que PAC+plasmina (p=ssn).

35

40

Ejemplo 4. Trombogenicidad *in vitro*.

Materiales y métodos

Evaluación de la trombogenicidad: Se obtuvo sangre total de voluntarios varones sanos, no fumadores, con consentimiento informado de conformidad con la Declaración de Helsinki, que no habían tomado aspirina dos semanas antes de la donación. La aprobación de este trabajo fue otorgada por la Universidad de Sydney, Comité de Ética en Investigación Humana (protocolo 05-2009/11668). Se realizaron experimentos al menos tres veces con sangre de diferentes donantes. Las muestras de AI, PAC o PAC+plasmina se incubaron con sangre total heparinizada (0,3 U/ml) durante 30 minutos a 37° C mientras se balanceaban. Las concentraciones de plasmina aumentadas de 0,1-10 U se usaron inicialmente para determinar una densidad de recubrimiento óptima. La trombogenicidad en condiciones de flujo se investigó utilizando un Chandler Loop modificado. En resumen, las muestras se expandieron con balón hasta los 28 cm de longitud de tubos Tygon S-50-HL (SDR, Australia), conectados en círculos (*loops*) con conectores de silicona de 1 cm y llenos de sangre total heparinizada (0,5 U/ml, 2,5 ml). Los círculos se hicieron girar a 34 rpm a 37 °C durante 60 min. El trombo y el acero de cada círculo se eliminaron para obtener imágenes y realizar el pesaje. La sangre de cada círculo se combinó con ácido-citrato-dextrosa (ACD) al 10 % (v/v) y se centrifugó a 1000 rpm durante 15 minutos para obtener suero. La P-selectina soluble se detectó mediante un ELISA (R&D Systems, EE. UU.). Para la evaluación de la endoprótesis, se evaluaron 0,3 U/ml de heparina, 90 minutos.

50

55

60

Resultados

Se estudió la trombogenicidad relativa del acero inoxidable, del PAC solo y de la plasmina unida covalentemente al PAC utilizando una prueba de adhesión de sangre total (figura 4). Las concentraciones crecientes de plasmina, 0,1 U, 1,0 U y 10 U, inmovilizada sobre el PAC demostraron una reducción drástica del peso del trombo dependiendo de la dosis, en comparación con los controles de acero inoxidable. El PAC solo redujo el peso del

65

trombo en $45,4 \pm 9,1$ %, pero se observaron reducciones adicionales de la plasmina 0,1 U ($62,3 \pm 6,4$ %), 1 U ($78,3 \pm 6,4$ %) y 10 U ($90,5 \pm 1,3$ %), con respecto al acero inoxidable ($p < 0,001$). Las reducciones en el peso del trombo también se demostraron en las imágenes representativas de las muestras. La fibrinólisis superficial también se demostró por incubación con sangre total que contenía fibrinógeno marcado con fluorescencia. Se observó una red de fibrina interconectada completa sobre el acero inoxidable después de 30 minutos, mientras que en el PAC solo esta red también estaba presente, pero era notablemente menos densa. En el PAC recubierto con plasmina solo se observaron los rudimentos de la fibrina interconectada.

Para evaluar más directamente la contribución de la plasmina unida a la superficie, la enzima se desnaturalizó antes de la incubación con PAC. Después de repetidos ciclos de congelación-descongelación, se confirmó que la plasmina estaba inactiva usando la conversión VALY descrita anteriormente (figura 5A). Las superficies unidas a plasmina desnaturalizada continuaron mostrando superioridad frente al acero inoxidable, pero fueron estadísticamente equivalentes a las superficies de PAC solo y presentaron pesos de coágulo significativamente más altos que la plasmina fresca sobre PAC (figura 5B).

Teniendo en cuenta el potencial para almacenar superficies de PAC recubiertas con plasmina, las muestras se liofilizaron antes de la rehidratación y se volvieron a analizar con sangre total. Inmediatamente después de la liofilización (figura 5C) y hasta 14 semanas después (figura 5D), los pesos del coágulo de plasmina recién preparada y almacenada sobre PAC fueron equivalentes.

En condiciones de flujo en un Chandler Loop modificado (figura 6A), las muestras de acero inoxidable generaron una importante formación de trombos ($61,8 \pm 8,3$ mg) (figura 6B). En cambio, la trombogenicidad del PAC solo se redujo significativamente a $15,8 \pm 1,1$ mg ($p < 0,001$), mientras que la inmovilización de 10 U de plasmina sobre el PAC redujo aún más el peso del coágulo a $1,4 \pm 0,4$ mg ($p < 0,001$), una reducción de $97,7 \pm 1,3$ % con respecto a los controles de acero inoxidable. Estas diferencias están bien demostradas en las imágenes representativas, que muestran un claro contraste entre las muestras de acero inoxidable coaguladas y las muestras de plasmina de 10 U, que casi no presentan trombos.

Esta sorprendente reducción de los trombos se produjo por una disminución significativa en la cantidad de sP-Selectina detectada en las muestras (figura 6C). En los controles de acero inoxidable, la activación de las plaquetas generó $119,7 \pm 4,8$ ng/ml de sP-Selectina, reducida a $88,1 \pm 0,9$ ng/ml en presencia de PAC solo. La adición de la plasmina en el PAC produjo una reducción adicional hasta los $57,16 \pm 3,5$ ng/ml, significativamente inferior al acero inoxidable ($p < 0,001$) y al PAC solo ($p < 0,01$), y no significativamente diferente del control sin implante, que representa el nivel de activación de referencia en esta prueba.

Las endoprótesis de acero inoxidable (3 mm x 10 mm, 316LVM) fueron cortadas con láser y electropulidas para eliminar cualquier contaminante de la superficie. Las endoprótesis tratadas con PAC eran macroscópicamente más oscuras que las endoprótesis de acero inoxidable sin tratar. Durante la microscopía electrónica de barrido (aumento de 50x), las endoprótesis recubiertas con PAC tenían un aspecto liso y contiguo, sin grietas ni deslaminación. La compatibilidad sanguínea de las prótesis de acero inoxidable, de PAC solo y de PAC+plasmina se demostró por incubación con sangre total que contenía fibrinógeno marcado con fluorescencia en un Chandler Loop. Tras 15 minutos, solo se observó una débil fluorescencia en todas las condiciones. En cambio, después de 30 minutos, se observó una deposición significativa de la fibrina en el acero inoxidable, mientras que poco se observó en el PAC+plasmina. La fluorescencia de la fibrina sobre el PAC solo fue intermedia entre estas dos condiciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo médico vascular que comprende una superficie, que consiste en un polihexano o un poliacetileno biocompatibles polimerizados con plasma, que tienen nitrógeno incorporado en su interior sobre un sustrato metálico, cerámico, de carbono o polimérico del dispositivo, que entra en contacto con la sangre, en donde la superficie está recubierta con plasmina que está unida covalentemente a esta.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el dispositivo es una endoprótesis.
- 10 3. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el dispositivo es una válvula cardíaca, una prótesis, una válvula implantada, una bomba implantada, componentes de una máquina de derivación cardiopulmonar en contacto con la sangre, un implante endovascular, un injerto con endoprótesis, un injerto, un ocluser vascular de cables de marcapasos, un dispositivo de oclusión de la orejuela auricular izquierda, una válvula endovascular, dispositivos de cierre vascular que incluyen el cierre de la comunicación interauricular y del agujero oval permeable, o filtros de vena
- 15 cava.
4. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el dispositivo está liofilizado.
- 20 5. Un método para fabricar un dispositivo médico vascular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende a) polihexano o poliacetileno polimerizados con plasma en nitrógeno o una mezcla de argón y nitrógeno para formar un polihexano o un poliacetileno que tienen nitrógeno incorporado en su interior, sobre una superficie o un componente de polímero, metal, cerámica o carbono del dispositivo, que entra en contacto con la sangre, y b) unir covalentemente la plasmina al polihexano o al poliacetileno polimerizados para recubrir la superficie o el
- 25 componente del dispositivo que entran en contacto con la sangre.

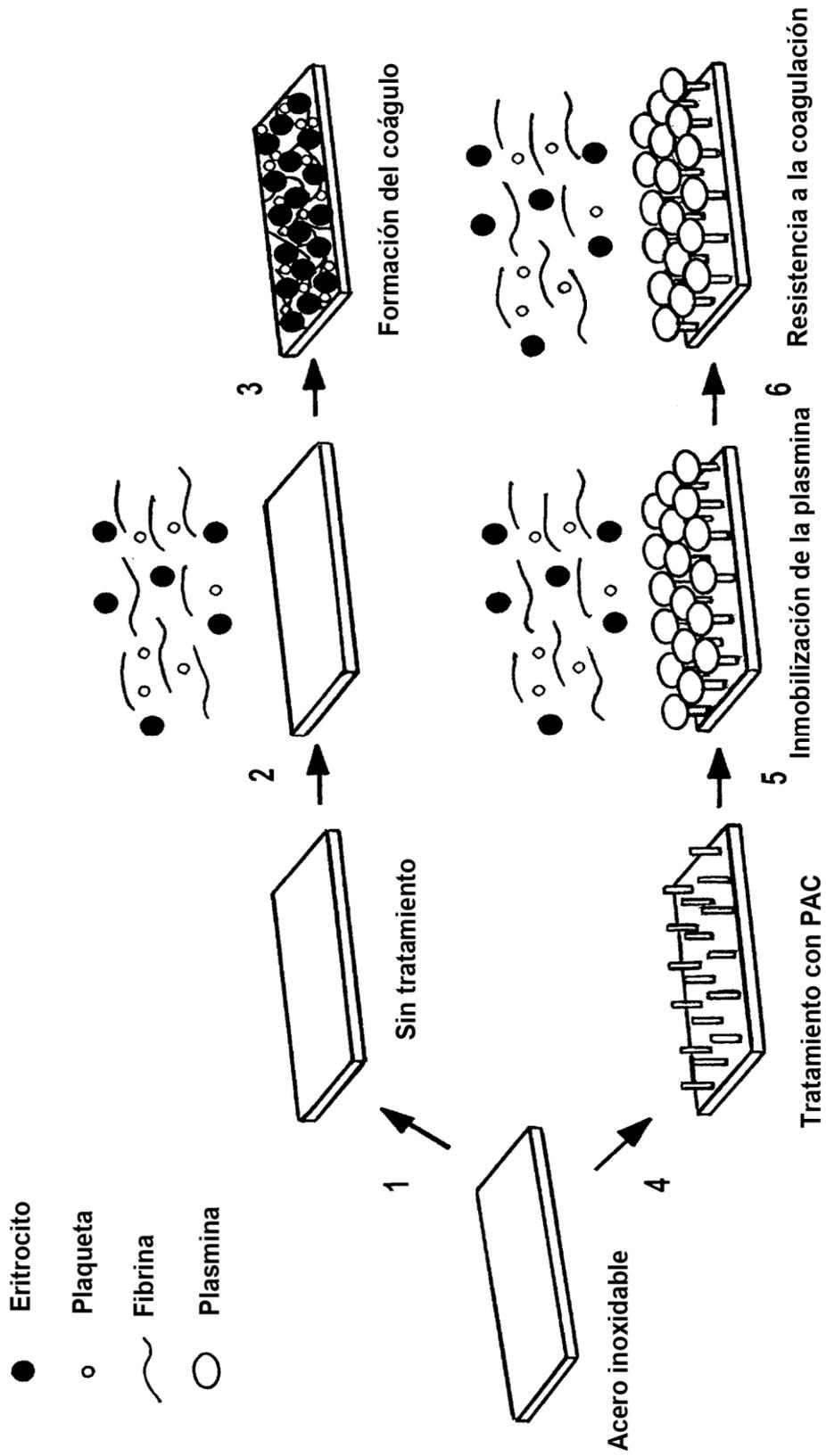


FIG. 1

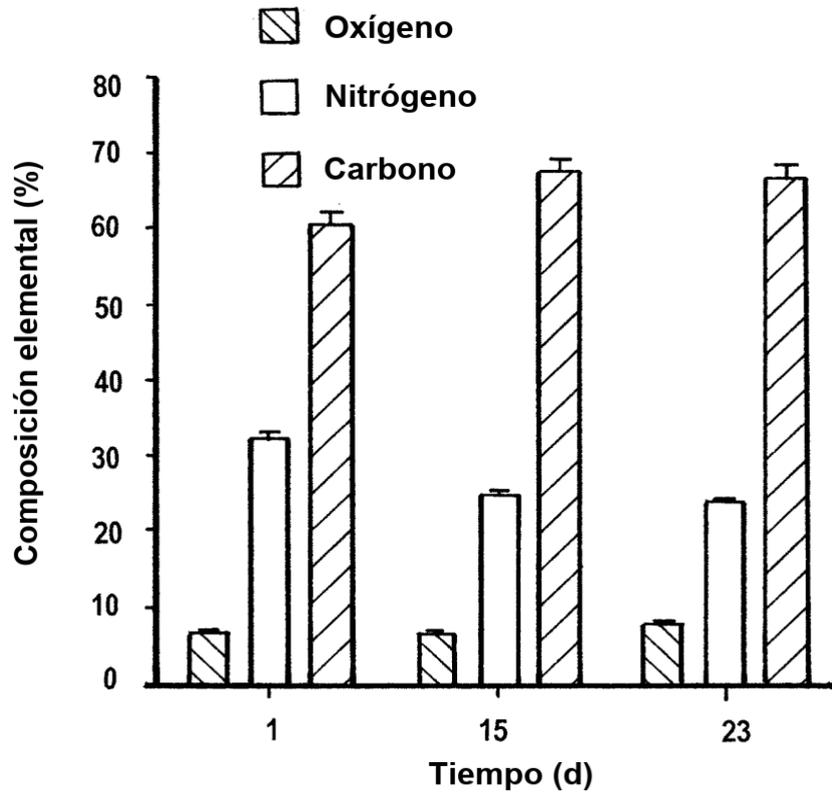


FIG. 2A

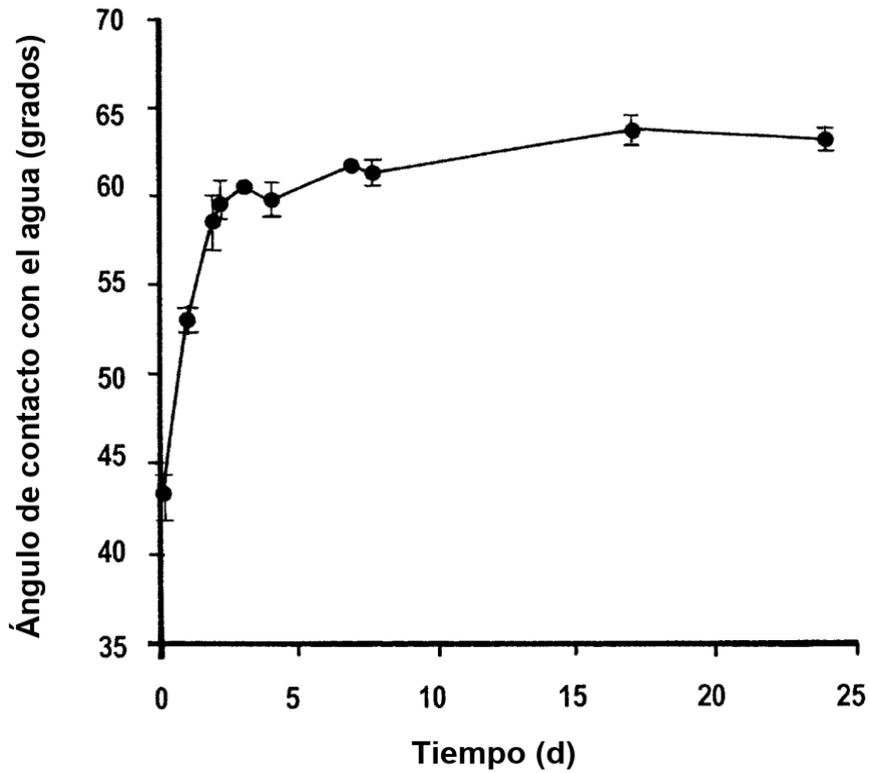


FIG. 2B

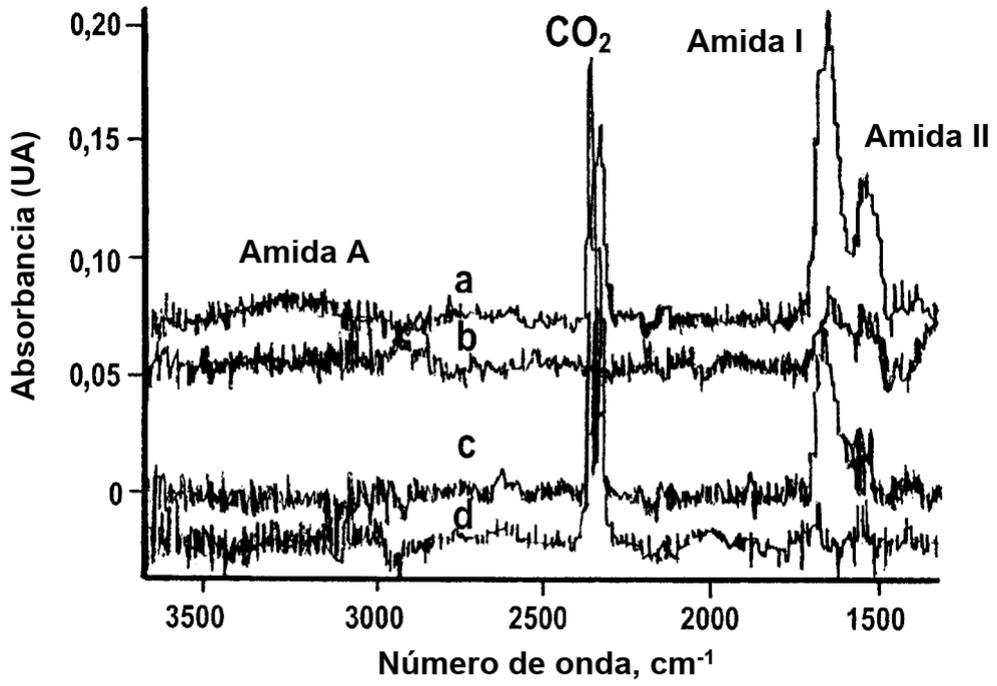


FIG. 2C

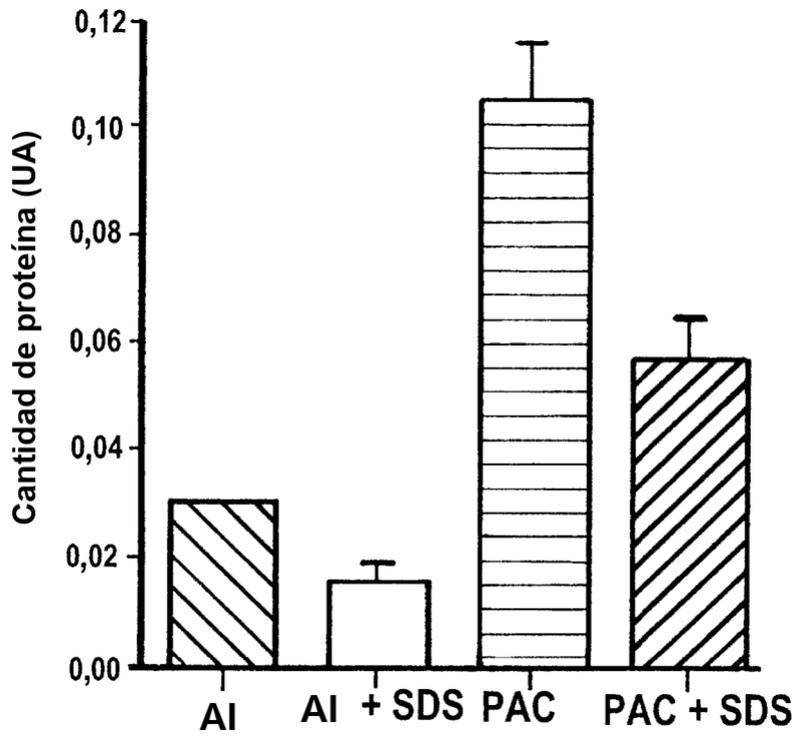


FIG. 2D

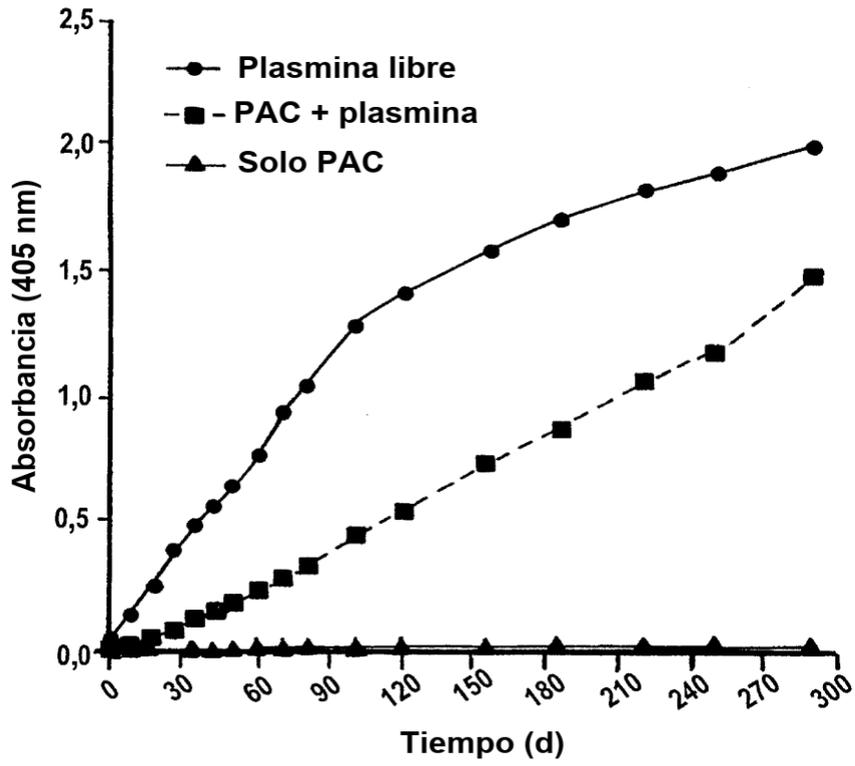


FIG. 3A

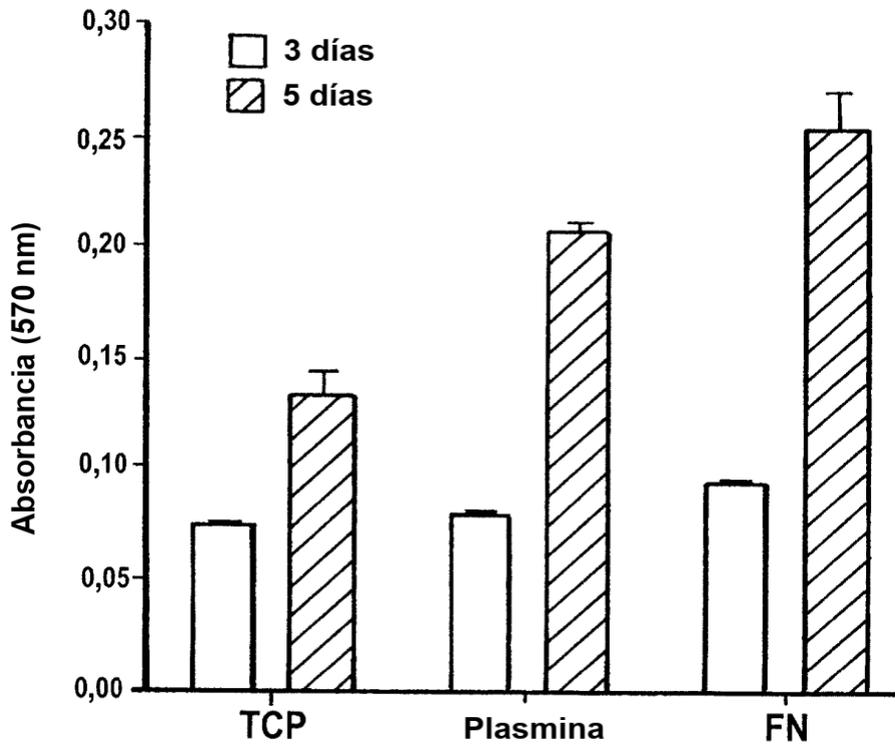


FIG. 3B

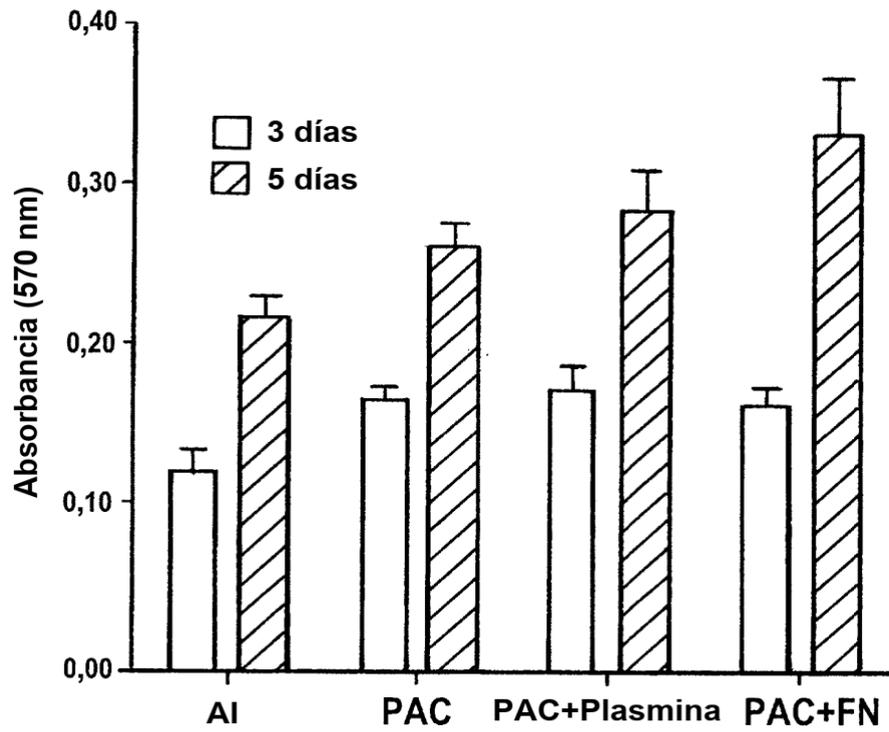


FIG. 3C

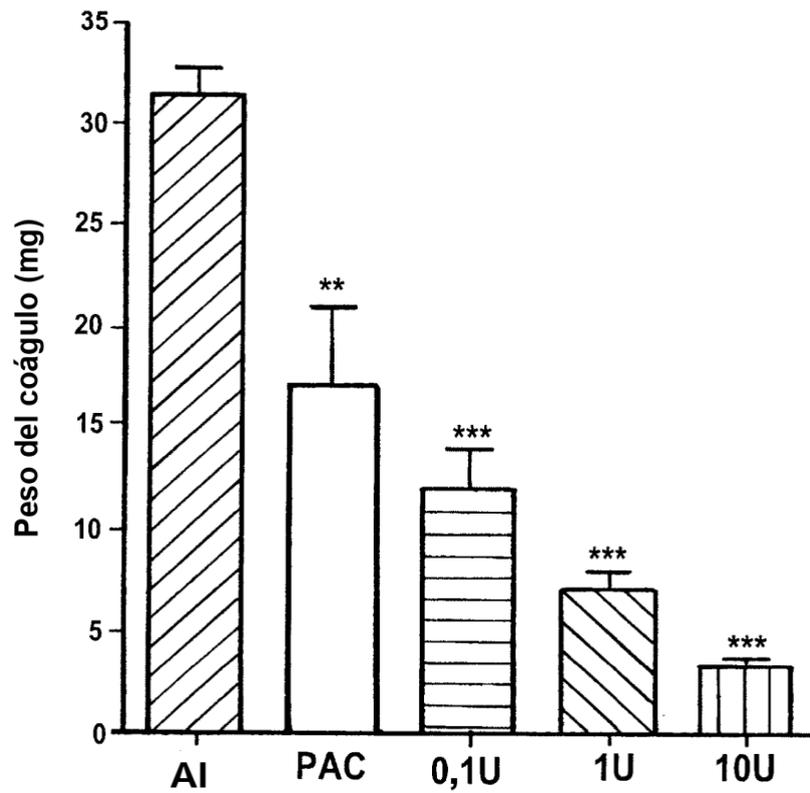


FIG. 4

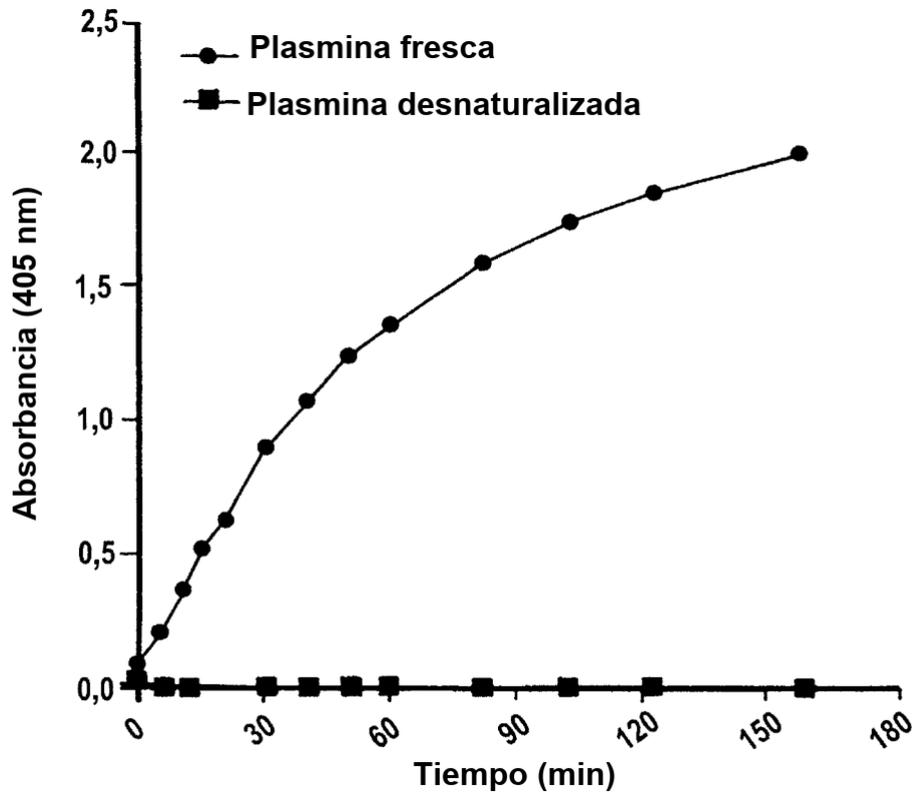


FIG. 5A

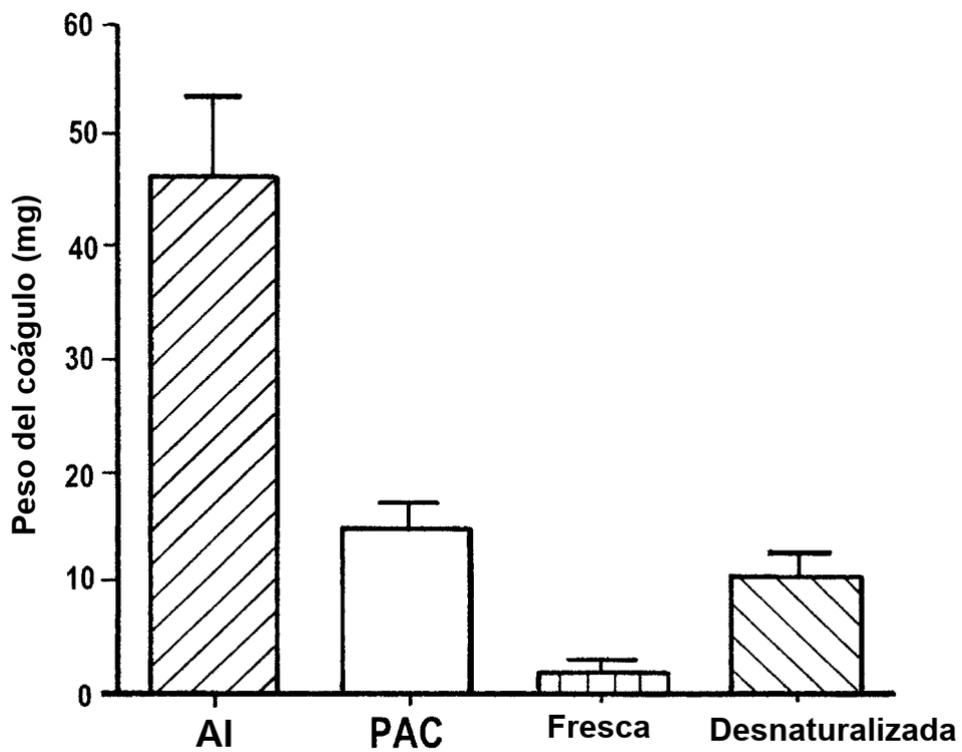


FIG. 5B

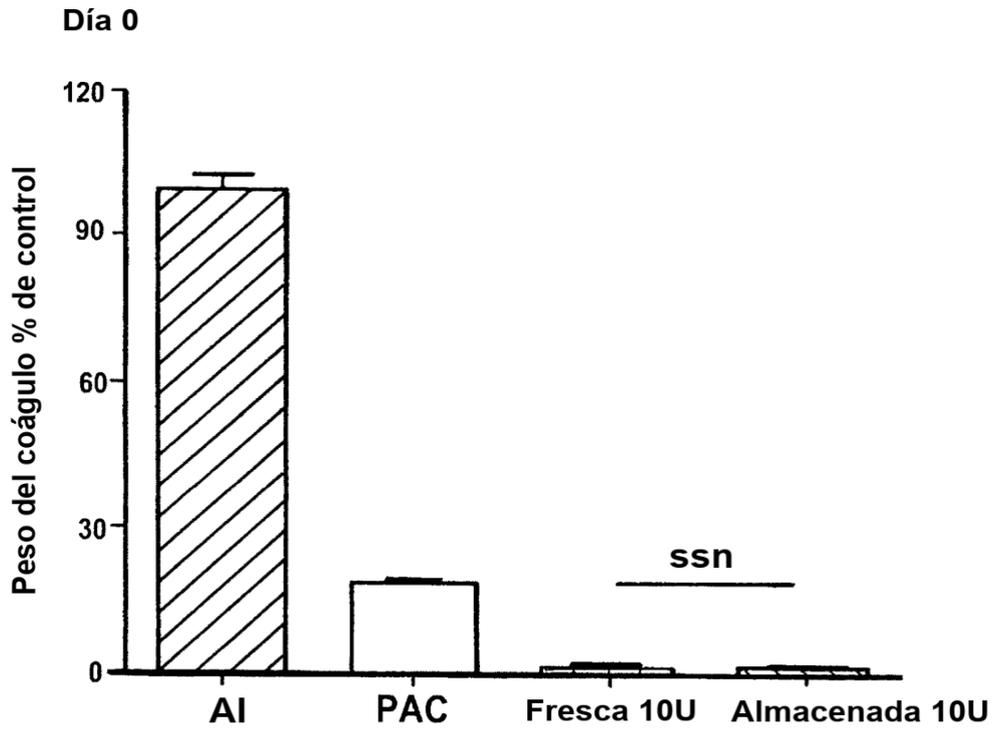


FIG. 5C

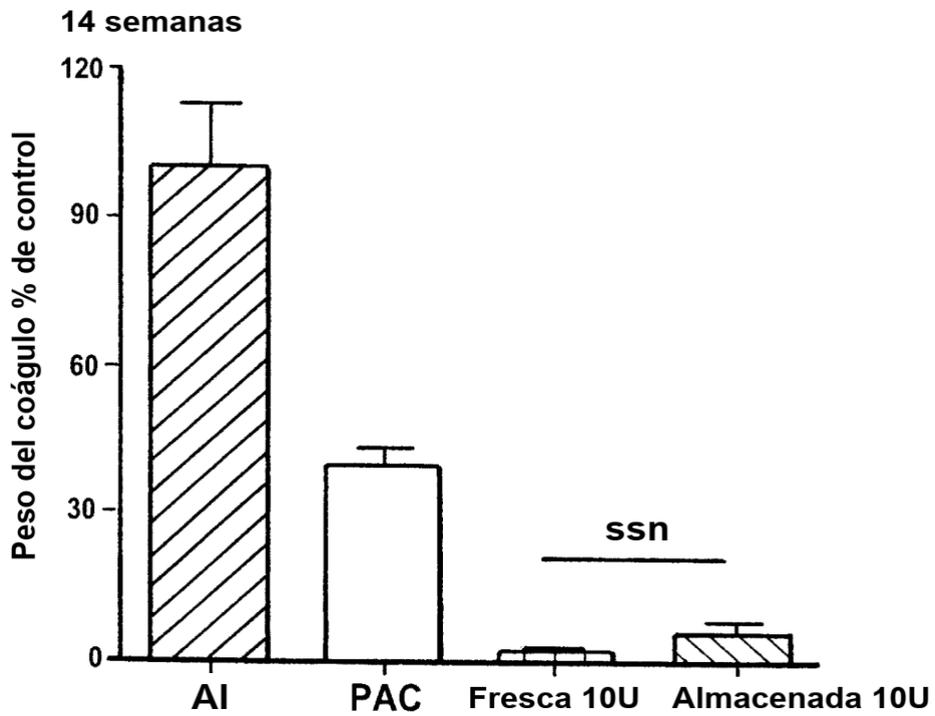


FIG. 5D

