

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 865**

51 Int. Cl.:

A61L 31/10 (2006.01)

A61L 31/14 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

A61F 2/82 (2013.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2007** **E 13179048 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2022** **EP 2716307**

54 Título: **Endoprótesis de elución de fármaco con una capa de liberación biodegradable fijada con un recubrimiento de imprimación electroinjetado**

30 Prioridad:

13.06.2006 US 812990 P

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

31.10.2022

73 Titular/es:

**ALCHIMEDICS (100.0%)
28 Cours Albert 1er
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BUREAU, CHRISTOPHE;
HAROUN, FÉRIAL y
HENAULT, ELODIE**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 926 865 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

Endoprótesis de elución de fármaco con una capa de liberación biodegradable fijada con un recubrimiento de imprimación electroinjertado

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a endoprótesis ("stents") de elución de fármacos.

10 **Antecedentes de la invención**

A lo largo de los años, el uso de recubrimientos para dispositivos médicos y la administración de fármacos se ha convertido en una necesidad, especialmente para aumentar la capacidad de los dispositivos médicos y los implantes.

15

Los recubrimientos de dispositivos médicos de elución de fármacos se han convertido en uno de los dispositivos biomédicos principales para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

20

Las enfermedades cardíacas y la insuficiencia cardíaca son dos de las afecciones de la salud más prevalentes en los Estados Unidos y en el mundo. En la enfermedad arterial coronaria, los vasos sanguíneos del corazón se estrechan. Cuando esto sucede, se reduce el suministro de oxígeno al músculo cardíaco. La causa principal de la enfermedad arterial coronaria es la acumulación de grasa en las arterias ("placa"). El tratamiento de la enfermedad arterial coronaria se realizó inicialmente mediante cirugía y CABG (injerto de derivación de la arteria coronaria), que son procedimientos normales y eficaces que se realizan por el cirujano cardíaco. La mortalidad y la morbilidad, sin embargo, fueron elevadas. En la década de 1960, algunos médicos desarrollaron un tratamiento poco invasivo utilizando dispositivos médicos. Pasando a través de una pequeña incisión en la arteria femoral, fueron capaces de tratar la enfermedad: se utiliza la angioplastia con globo (que se utiliza para ensanchar una arteria que se ha estrechado utilizando un catéter con globo que se infla para abrir la arteria: ACTP = angioplastia coronaria transluminal percutánea) en pacientes con enfermedad arterial coronaria. Después de la angioplastia con globo, aproximadamente del 40 al 50% de las arterias coronarias se ven afectadas por reestenosis (recurrencia de estrechamiento de un vaso sanguíneo después de que se haya abierto, generalmente mediante angioplastia con globo) dentro de un periodo de 3 a 6 meses ya sea debido a trombosis (el desarrollo de un coágulo de sangre en los vasos que puede obstruir un vaso sanguíneo y detener el flujo de sangre) o a un crecimiento anormal de tejido. Como consecuencia, la reestenosis constituye la principal limitación de la eficacia de la ACTP.

25

30

35

La introducción de la endoprótesis metálica sin recubrimiento (BMS), a fines de la década de 1980, que se utiliza para mantener expandidas las arterias coronarias, contribuyó a aliviar en alguna medida este problema, así como el de las disecciones de las arterias después de inflar el globo en el procedimiento de ACTP. La endoprótesis es un tubo de malla montado en un catéter con globo (un tubo flexible fino y largo que se puede insertar en el cuerpo; en este caso, se engarza al corazón). Pero la BMS continúa asociada a una tasa de reestenosis de aproximadamente el 25% de los pacientes afectados 6 meses después de la inserción de la endoprótesis: los puntales de la endoprótesis terminan embebidos por el tejido arterial en crecimiento. Este tejido está esencialmente formado por células musculares lisas (CML), cuya proliferación está provocada por el daño inicial en la arteria después de la aposición de la endoprótesis. La aposición, de hecho, destruye la capa de células endoteliales (CE) que tienen que proliferar posteriormente y migrar para recolonizar los puntales de la endoprótesis sobre las CML a fin de detener su proliferación.

40

45

50

La industria biomédica solucionó parcialmente esta tasa de fracaso diseñando una nueva generación de endoprótesis que proporcionan un recubrimiento capaz de liberar fármacos seleccionados (sirolimus, paclitaxel, ABT578, tacrolimus, everolimus, etc.) en las paredes de los vasos para prevenir la reestenosis. La endoprótesis de elución de fármacos (DES) atrajo una atención cada vez mayor a finales de la década de 1990, dado que potencialmente ofrece una forma más eficaz de reducir la tasa de reestenosis a una sola cifra. Idealmente, el fármaco debería prevenir la proliferación de las CML y permitir a la vez la recolonización temprana por parte de CE activas, ya que estas últimas células producen espontáneamente óxido de nitrógeno (NO), una molécula pequeña que actúa como señal para detener la proliferación de las CML.

55

60

65

La mayor parte de las DES presentes en el mercado se fabrican sobre la base de una matriz de liberación polimérica a partir de la cual se eluye el fármaco. El polímero se denomina bioestable: el polímero se mantiene permanentemente en la endoprótesis y, por lo tanto, se supone que tiene poco efecto tanto sobre la respuesta inflamatoria como sobre la recolonización por parte de las CE. El principal inconveniente de estas DES es que no pueden liberar el 100% del fármaco que alojan. Una consecuencia significativa de esto es que el proceso de recolonización resulta impedido por el fármaco que permanece en el recubrimiento (ya que la mayor parte de los fármacos "destruyen" las CE de forma igual o más eficaz que las CML). Este inconveniente tiene consecuencias potencialmente letales y drásticas para los pacientes y, por lo tanto, para la industria de las DES. De hecho, a pesar del hecho de que la reestenosis podría reducirse desde aproximadamente el 20% con BMS a aproximadamente el 5% con DES, la industria se enfrenta actualmente a un gran desafío revelado y no resuelto

por las DES actuales: el fenómeno de la trombosis tardía, es decir, la recoagulación de la arteria un año o más después de la implantación de la endoprótesis.

Es conocido desde hace mucho tiempo que la implantación de endoprótesis metálicas sin recubrimiento era asimismo la fuente de la trombosis, además de la reestenosis, pero que la primera podría tratarse fácilmente mediante una biterapia sistémica asociada a dos agentes antitrombóticos, normalmente aspirina y clopidogrel. (Plavix®). Normalmente, a los pacientes a los que se les aplicó una endoprótesis se les prescribió una biterapia de este tipo durante 1 a 2 meses. Los datos de seguimiento han indicado durante mucho tiempo los excelentes resultados de esta combinación con respecto a la trombosis. Con las endoprótesis de elución de fármacos se informó de numerosos casos de recoagulación de la arteria debido a la coagulación (trombosis) poco después de la interrupción de la biterapia, lo que obligó a los cardiólogos a mantener la biterapia durante 3, 6, 9 y actualmente 12 meses o más. Se informó de varios casos en los que pudo tener lugar un infarto de miocardio con trombosis total por endoprótesis solo un par de semanas después de la interrupción de una biterapia de 18 meses.

La trombosis tardía es una complicación abrupta que puede ser letal cuando ocurre si el paciente no está bajo seguimiento médico o, incluso si lo está, mientras el paciente se encuentra lejos del centro del tratamiento o de un centro médico adecuadamente equipado. Además, la biterapia es un procedimiento difícil de llevar a cabo, ya que algunos pacientes deciden interrumpirla por sí mismos después de un período que estiman largo, o pueden olvidarse de tomar sus medicinas o pueden tener que someterse a una intervención clínica que no se puede anticipar, y por lo tanto deben interrumpir el tratamiento antitrombótico.

Las razones exactas que explican el fenómeno de la trombosis tardía aún no se conocen completamente. Los patólogos estiman que el problema de la trombosis tardía revela una recolonización incompleta de la endoprótesis vascular por parte de las CE, dejando los materiales metálicos o poliméricos en contacto con la sangre durante períodos prolongados, en los que es probable que se produzca una adhesión plaquetaria que provoque la precipitación catastrófica de un trombo. Han surgido interpretaciones alternativas que afirman que la recolonización incompleta por parte de las CE es el resultado de la liberación incompleta del fármaco desde la capa de liberación, que "destruye" las CE en migración en su intento de migrar y proliferar en la superficie de dicha capa de polímero + fármaco. Por lo tanto, los riesgos de trombosis tardía son un grave inconveniente de las DES existentes.

Debido a las restricciones mecánicas, muy elevadas, a las que se enfrenta una endoprótesis durante su proceso de fabricación (engarce en el globo), durante su recorrido en la arteria (especialmente sobre lesiones calcificadas) y durante su expansión (el diámetro de la endoprótesis aumenta en un factor de 3 a 5), los agrietamientos descontrolados y las deslaminaciones son a menudo la norma. Los agrietamientos y las deslaminaciones pueden provocar una "rugosidad" artificial que varía de unas pocas decenas de micras a varios milímetros, y que, por lo tanto, es propensa a obstaculizar seriamente la recolonización adecuada de la endoprótesis por parte de las CE.

Sin embargo, la "rugosidad" por sí misma no puede explicar por sí sola los obstáculos a la recolonización por parte de las CE. Un estudio que evaluó la recolonización por CE obtenida a los 28 días en arterias de cerdo con dos endoprótesis Taxus® o dos endoprótesis Cypher® superpuestas en la misma arteria, en comparación con sus contrapartes de metal sin recubrimiento respectivas, es decir, dos Bx Velocity® o dos Express® en la misma arteria, respectivamente, evidencia que:

- aunque la "rugosidad" de la superficie que se va a recolonizar es bastante alta tanto con la DES como con la BMS (debido a la superposición entre las dos endoprótesis), la recolonización siempre es mejor con la BMS en comparación con la DES;
- cualquiera que sea la DES, Cypher® o Taxus®, es decir, cualquiera que sea el fármaco que se está liberando, la recolonización siempre es mejor con la BMS correspondiente.

Este resultado sugiere inequívocamente que, aparte de la "rugosidad" del recubrimiento y de la superficie de la endoprótesis después del despliegue, la recolonización siempre es superior en ausencia de fármaco. Esto se debe correlacionar con el hecho de que:

- todas las DES existentes tienen una capa bioestable. La liberación del fármaco se obtiene por difusión pura y, por lo tanto, nunca puede ser completa: siempre permanece algo de fármaco en el recubrimiento que se va a recolonizar durante períodos prolongados;
- todos los fármacos en uso en las DES existentes (sirolimus, paclitaxel) tienen una concentración tóxica umbral que es comparable o incluso más baja frente a las CE en comparación con las CML, es decir, pueden "destruir" a las CE de forma igual o incluso mejor que a las CML:

Esto apunta a un grave inconveniente de las DES existentes en que mantienen de forma local fármacos que son tóxicos para las CE durante períodos prolongados.

Por último, pero no menos importante, estos fármacos pueden tener un efecto sobre la remodelación de la arteria.

Se observó una denominada "mala posición de la endoprótesis" que muestra que algunos de los puntales de la endoprótesis no estaban completamente en contacto con las paredes de las arterias. Se cree que la mayor parte de las malas posiciones de la endoprótesis se deben al efecto del fármaco, especialmente en el caso de sirolimus, que provoca una denominada "remodelación positiva" de la arteria, es decir, su sobredilatación progresiva: la endoprótesis está inicialmente en contacto con las paredes arteriales, pero eventualmente "flota" dentro de la arteria cuyo diámetro aumenta bajo el efecto del fármaco. En tal caso, algunos de los puntales de la endoprótesis permanecen sin recolonizar por las CE (ya que están demasiado lejos de la pared de la arteria) y pueden ser la fuente de una trombosis derivada del contacto directo del material polímero con la sangre. Dicha trombosis puede no aparecer mientras el paciente se encuentra en biterapia antiplaquetaria, pero comienza pronto, justo después de que se interrumpa la biterapia (trombosis tardía). Esto, nuevamente, señala el grave inconveniente de las endoprótesis de elución de fármacos existentes debido a la prolongada permanencia del fármaco en la superficie de la endoprótesis.

El artículo "Surface modification of metallic cardiovascular stents by strongly adhering aliphatic polyester coatings", J BIOMED MATER RES A., vol. 76, nº 3, 29 de noviembre de 2005 (29-11-2005), páginas 521-529, divulga el electroinjerto de recubrimientos de polímeros sobre la superficie de las endoprótesis. El documento US-A-2004170685 divulga una endoprótesis con capas diferentes, siendo una de ellas biodegradable y conteniendo un fármaco.

Objetivo de la invención

El objetivo de la invención es proporcionar una endoprótesis que se comporte como una DES a corto plazo para prevenir la reestenosis, y que tenga una trayectoria a largo plazo similar a la de una BMS para evitar la trombosis y permitir la proliferación temprana y la migración de las CE antes de la remodelación. Como se menciona anteriormente, se cree que la trombosis tardía está relacionada con:

- una liberación incompleta del fármaco;
- una integridad deficiente del recubrimiento debido a la falta de adherencia del recubrimiento a la superficie de la endoprótesis, lo que provoca agrietamientos y deslaminaciones que son fuentes potenciales de "rugosidad" que dificultan la recolonización por parte de las CE;
- un deficiente comportamiento procurativo (a largo plazo) del recubrimiento para la recolonización por CE en casos de aposición incompleta de la endoprótesis (ISA) debida al fármaco.

En la DES según la invención, el fármaco, si está presente, se libera a través de un polímero biodegradable, que desaparecerá después de unas pocas semanas, liberando así el 100% del fármaco. La fabricación de recubrimientos que utilizan dichos polímeros biodegradables debe realizarse mediante el uso de una capa subyacente de adhesión para promover notablemente una buena integridad mecánica para una aposición apropiada de la endoprótesis.

En consecuencia, se propone una endoprótesis de elución de fármaco como se expone en la reivindicación 1

La DES puede comprender además una capa de cubierta superior ("topcoat") biodegradable.

El recubrimiento electroinjertado se utiliza como recubrimiento de imprimación eficaz para promover la adhesión entre la superficie de la endoprótesis metálica y el recubrimiento de polímero subsiguiente. El recubrimiento electroinjertado puede aplicarse a la endoprótesis y secarse, operación seguida de la aplicación del fármaco-polímero. El recubrimiento de polímero subsiguiente puede contener uno o más compuestos terapéuticos para proporcionar propiedades farmacéuticas a la endoprótesis de elución de fármaco. El recubrimiento electroinjertado de imprimación actúa como un puente entre sustratos y recubrimientos de polímeros orgánicos, con buenas propiedades de adhesión al metal y al fármaco-polímero.

La tecnología de electroinjerto permite la unión covalente a la superficie, proporcionando capas de unas pocas decenas de nanómetros a unos pocos cientos de nanómetros, y un control nanométrico, así como la deposición de materiales de p-BuMA que son conocidos en el vascular. Además, las capas electroinjertadas obtenidas son uniformes y conformes a la superficie de la endoprótesis. Dicho recubrimiento electroinjertado muestra una buena predisposición a la migración y la proliferación celular, y en particular es absolutamente uniforme y carente de agrietamientos y deslaminaciones. A medida que la matriz de liberación biodegradable desaparece, esta capa subyacente se encontrará en contacto con las CE o las CML (recolonización en progreso) o con la sangre (recolonización incompleta, ISA, etc.), o ambas. Por lo tanto, es de gran importancia que dicha capa subyacente sea lo más uniforme posible y, en particular, que no se rompa, lo que sería un obstáculo para la recolonización completa por parte de las CE.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 (A) representa la liberación acumulada de sirolimus a lo largo del tiempo (días) a partir de un recubrimiento de doble capa de PLGA, *in vitro*.

La figura 1 (B) representa la liberación acumulada de sirolimus a lo largo del tiempo (días) a partir de un recubrimiento de doble capa de poli(lactida), *in vitro*.

La figura 2 representa la liberación fraccionada de sirolimus a lo largo del tiempo (días) a partir de PLGA o PLA, *in vivo*.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas en la presente memoria

La endoprótesis de elución de fármaco (DES), **comprende:**

un armazón de endoprótesis,

un recubrimiento electroinjertado dispuesto sobre el armazón de la endoprótesis, y

un recubrimiento de polímero biodegradable que aloja un fármaco dispuesto sobre el recubrimiento electroinjertado.

El armazón de la endoprótesis

El armazón de la endoprótesis comprende ventajosamente una base metálica. En particular, el armazón de la endoprótesis comprende un material seleccionado del grupo que consiste en acero inoxidable, nitinol, tantalio, aleaciones MP35N o MP20N de cobalto-cromo, platino, titanio, una aleación biocompatible adecuada, un material biocompatible adecuado y una combinación de los mismos.

El recubrimiento electroinjertado

La capa electroinjertada funciona como una imprimación de adhesión para la capa superior biodegradable (durante el procedimiento de fabricación, engarce y colocación de endoprótesis). El recubrimiento de imprimación electroinjertado es una capa uniforme. Esta capa presenta preferentemente un espesor de entre 10 nm y 1.0 micra, en particular un espesor de entre 10 nm y 0.5 micras, más particularmente de entre 100 nm y 300 nm. Dicho espesor, que es más reducido que el radio mínimo de curvatura alcanzable en cualquier punto de la superficie de la endoprótesis, puede asegurar que el recubrimiento no se agriete. Las capas electroinjertadas son aptas para prevenir el agrietamiento y la deslaminación de las capas de polímeros biodegradables, y muestran una recolonización igual o mejor que las BMS de acero inoxidable. Además, el uso de una capa electroinjertada que presenta un espesor de por lo menos aproximadamente unas pocas decenas o de cientos de nanómetros asegura un buen refuerzo de la adherencia de la capa biodegradable superior, gracias a la interdigitación entre las dos capas poliméricas.

La capa de p-BuMA electroinjertada, puede tener además un comportamiento de pasivación y bloquea la liberación de iones de metales pesados (en el flujo sanguíneo o en las paredes arteriales) de la superficie de acero inoxidable. Se cree que dichos iones de metales pesados contribuyen a la inflamación inicial causada por la introducción de la endoprótesis metálica en la sangre, que es un medio electrolítico y, por lo tanto, provoca la oxidación parcial de cualquier metal hasta que se alcanza el equilibrio de Nernst. En particular, se observa, en secciones transversales longitudinales, que los espesores de las paredes arteriales de la capa electroinjertada y la rama biodegradable (sin fármaco) del estudio son siempre más pequeños que los de la rama de la endoprótesis metálica sin recubrimiento, lo que evidencia menos granuloma, es decir, menos inflamación: este resultado es la confirmación de lo que se observó con el estudio de 28 días en conejos, en el que se detectó menos inflamación con las endoprótesis recubiertas con una mera capa de p-BuMA electroinjertado en comparación con las BMS (ver los ejemplos 11 y 12).

La capa electroinjertada tiene un efecto no trombótico (o tromborresistente) y un efecto procurativo (una vez que la capa de liberación biodegradable ha desaparecido, se promueve la proliferación y la adhesión de las CE activas). En caso de que las CE comiencen a proliferar en la parte superior de la capa biodegradable que contiene el fármaco, es decir, antes de que desaparezca por completo, el mecanismo de hidrólisis de dichos polímeros biodegradables continuará por debajo, y pronto las CE estarán en contacto con la capa electroinjertada. El efecto procurativo es mayor con una capa electroinjertada bioestable que asegura una recolonización adecuada por parte de las CE a largo plazo.

En el ejemplo 13 se ha realizado y descrito un ensayo de 60 días con cerdos con una capa compuesta constituida por una capa subyacente de p-BuMA (poli(metacrilato de butilo)) electroinjertado (150 nm) recubierta con una capa de liberación biodegradable de PLGA (poli-lactida-co-glicólido) (5 μ m). Este estudio pudo mostrar en primer lugar

que la capa de liberación biodegradable había desaparecido después de las primeras 4 semanas, liberando así el 100% del fármaco. Asimismo demostró que las endoprótesis recubiertas con una capa electroinjertada y capas biodegradables están completamente recolonizadas por las células endoteliales a las 8 semanas: como se sabe que la capa biodegradable ha desaparecido después de 4 semanas, esto significa que la buena recolonización es el resultado de la interacción de la capa electroinjertada *so/a* con la arteria y el flujo sanguíneo.

El rendimiento general de la capa electroinjertada y las endoprótesis biodegradables es estadísticamente superior al de las BMS, incluso en la situación (difícil) de una bicapa compuesta (capa electroinjertada + depósito biodegradable) en la que no hay ningún fármaco dentro de la capa de liberación biodegradable. La DES según la invención permitiría la interrupción de la biterapia antiplaquetaria poco después de la implantación de la endoprótesis debido a una mejor recolonización por parte de las CE.

La película orgánica obtenida mediante el electroinjerto es poli-BUMA (poli(metacrilato de butilo)).

Adherencia entre el recubrimiento electroinjertado y la capa biodegradable (capa que contiene el fármaco o capa de cubierta superior)

La capa superior biodegradable puede adherirse sobre la capa electroinjertada:

- formando un enlace químico con el polímero electroinjertado (ver por ejemplo la solicitud de patente WO04/005410);
- insertando los precursores químicos de polímero electroinjertado de dicha capa biodegradable, para provocar su formación dentro de la película de polímero electroinjertado, que actuará entonces como una capa de anclaje para dicha capa biodegradable (ver por ejemplo las solicitudes de patente WO04/074537 y WO04/075248);
- forzando la interpenetración del polímero biodegradable preformado dentro de la capa electroinjertada por interdigitación. La interdigitación se refiere al hecho de que las cadenas poliméricas de dicho polímero biodegradable pueden "arrastrarse" o "reptar" dentro de la capa electroinjertada, y producir por lo menos un "bucle" dentro de la capa electroinjertada. Para un polímero, un "bucle" es el tamaño típico de una cadena cuando está en una configuración aleatoria: se puede evaluar mediante la medida del denominado radio de giro del polímero. Aunque está de algún modo relacionado con el polímero preciso, con su estructura molecular, etc., el radio de giro de un polímero es la mayor parte del tiempo inferior a 100 nm, lo que sugiere que para permitir una mejor adhesión, las capas electroinjertadas deben ser más gruesas que este valor umbral para poder alojar por lo menos un bucle del polímero del que está fabricada la capa superior.

La interdigitación es una forma de obtener una excelente adhesión de la capa biodegradable sobre la capa electroinjertada, siempre que esta última:

- sea más gruesa que aproximadamente 100 nm;
- tenga una humectabilidad (es decir, hidrófoba/hidrófila) idéntica a la del polímero biodegradable superior para permitir el "mezclado" entre los dos;
- presente una temperatura de transición vítrea inferior a la del polímero biodegradable superior para obtener una interdigitación térmica a una temperatura suficientemente baja que conserve la estabilidad del fármaco; o
- esté por lo menos hinchado por un disolvente del polímero biodegradable superior mencionado o un disolvente que contiene una dispersión del polímero biodegradable superior mencionado o de sus componentes, de forma que la interdigitación pueda forzarse de forma eficaz mediante la aposición de una mera gota de dicho líquido en la superficie de la capa electroinjertada, a temperatura ambiente: el líquido, que hincha la capa electroinjertada, provoca la inserción de los componentes de la solución o dispersión en la capa electroinjertada, y después se evapora para dejar un material compuesto interdigitado.

Esta última condición es suficiente para obtener la formación de una interfaz buena y fuerte entre la capa de liberación biodegradable y la capa electroinjertada.

La interdigitación es **un modo preferido** de la invención para construir la interfaz entre la matriz de liberación y la capa electroinjertada en comparación con la unión química o la estratificación: dado que la matriz de liberación se selecciona en la presente memoria de forma que sea biodegradable, lo que permanece es un polímero (electroinjertado) de estructura conocida, es decir, sin ningún grupo químico sin reaccionar ni ningún enlace hidrolizado que promueva una reactividad residual de la película electroinjertada que provoque reacciones inflamatorias y/o trombóticas.

5 La interdigitación requiere que se pueda esparcir una solución que contenga la capa de polímero biodegradable y, opcionalmente, el fármaco sobre una endoprótesis recubierta con una capa electroinjertada, seleccionada apropiadamente de forma que presente las propiedades de humectabilidad deseadas. El PLGA, por ejemplo, es fácilmente soluble en dicloroetano, diclorometano o cloroformo, al igual que la mayor parte de los fármacos hidrófobos tales como el sirolimus, el paclitaxel o el ABT-578. En tal caso, el p-BuMA electroinjertado es una elección adecuada para proporcionar la interfaz interdigitada deseada, ya que se hincha fácilmente con cloroformo o diclorometano (e incluso es soluble en los mismos).

10 Desde el punto de vista de la fabricación, este esparcido se puede realizar mediante inmersión o pulverización. La inmersión se emplea menos, ya que no permite tener capas más gruesas de aproximadamente 2 a 3 μm por proceso de inmersión: para espesores más altos, se debe secar completamente una primera capa antes de un nuevo proceso de inmersión, para evitar que la capa ya depositada se vuelva a disolver. Esta restricción hace que la inmersión sea muy poco conveniente para capas de más de 2 μm . La pulverización es más fácil de llevar a cabo, a este respecto (ver el ejemplo 14). Una boquilla que pulveriza la solución anterior se orienta hacia la endoprótesis, que gira para presentar todas las superficies externas a la pulverización. Para encontrarse en las condiciones anteriores para obtener la interfaz interdigitada adecuada, se trabajará ventajosamente en las denominadas condiciones de "pulverización en húmedo" o de "baja presión": la solución que se va a pulverizar tiene una viscosidad baja (normalmente < 1 cP, siendo la viscosidad de cloroformo puro de 0.58 cP), la boquilla se encuentra a corta distancia de la endoprótesis giratoria, y la presión del gas de vector inerte (nitrógeno, argón, aire comprimido, etc.) en la boquilla es generalmente inferior a 1 bar. Estas condiciones conducen a la nebulización del líquido en pequeñas gotas de líquido, que se mueven en la atmósfera de la cámara de pulverización para golpear la superficie de la endoprótesis electroinjertada: dado que la capa de polímero electroinjertada y la solución de pulverización tienen la misma humectabilidad, la gota muestra un ángulo de contacto muy bajo (= buena humectación), y la colección de gotas sobre la superficie es, por lo tanto, filmogénica desde el principio. Además de preparar una buena interfaz entre la capa biodegradable y la capa electroinjertada, el sistema de pulverización de "baja presión" permite la fabricación de endoprótesis recubiertas con muy poca cinta entre los puntales.

30 El movimiento relativo de la boquilla con respecto a la endoprótesis permite la deposición de una capa uniforme y relativamente fina (< 1 μm) en un único disparo que todavía está cargado con disolvente. La rotación y la renovación del aire permiten la evaporación de dicho disolvente, más fácilmente cuanto más fina sea la capa, dejando la capa de polímero (+ fármaco) en la superficie. Después se puede pulverizar una segunda capa sobre la primera y así sucesivamente, para alcanzar el espesor deseado (y, por lo tanto, la carga deseada). Dado que son necesarias varias pulverizaciones para alcanzar el espesor deseado, el sistema de pulverización de "baja presión" se puede implementar en lotes, en el que varias endoprótesis están girando en paralelo con una boquilla de pulverización sobre todas y cada una de las endoprótesis secuencialmente, permitiendo que las otras endoprótesis se sequen por evaporación mientras que otra está siendo pulverizada. Esto mantiene el rendimiento del sistema lo suficientemente alto a pesar de que el enfoque de pulverización de baja presión es de naturaleza muy secuencial.

40 Dicho sistema de pulverización de baja presión se describe en el ejemplo 14, que puede manipular 20 endoprótesis giratorias por lote y una única boquilla que se mueve por encima de las endoprótesis gracias a un sistema de barrido X-Y. Una particularidad de este sistema es que las endoprótesis giratorias se encuentran dentro de la caja (para permitir la extracción con disolvente y la seguridad del operador), mientras que el sistema XY está fuera de la caja: el movimiento de la boquilla se controla a través del techo de la caja por medio de imanes, conservando la estructura de "carcasa cerrada" de la caja a la que está conectado el soporte de muestras a la puerta lateral por medio de un dispositivo de transporte de muestras desmontable, y se inserta y se conecta al rotor en la caja al abrir la puerta desde el interior con los guantes.

50 La capa biodegradable que contiene el fármaco

La capa de liberación biodegradable presenta ventajosamente un espesor de 1 a 200 μm , más ventajosamente un espesor de aproximadamente 1 a 10 μm de espesor (según la carga) para lograr la liberación del fármaco durante un período prescrito.

55 El recubrimiento de fármaco-polímero puede incluir uno o más fármacos. Cada fármaco puede incluir un agente bioactivo. El agente bioactivo puede ser un fármaco farmacológicamente activo o un compuesto bioactivo. El recubrimiento de fármaco-polímero puede estar sujeto a degradación durante el procesamiento, envasado, esterilización o almacenamiento de una endoprótesis de elución de fármaco-polímero. Durante la esterilización, por ejemplo, se puede producir la oxidación del fármaco o del polímero, produciendo un daño hidrolítico, la escisión de los enlaces poliméricos, la degradación del polímero y/o del fármaco, o el agrietamiento real o el escamado del recubrimiento de fármaco-polímero. Los recorridos de temperatura de la endoprótesis en proceso o procesada pueden incitar a la deslaminación de la totalidad o de una porción del recubrimiento de fármaco-polímero. La presente invención resuelve este problema mediante el uso de un recubrimiento de imprimación electroinjertado entre el recubrimiento de fármaco-polímero y la endoprótesis metálica, para reducir o prevenir la deslaminación del fármaco-polímero.

Los medicamentos pueden encapsularse en un recubrimiento de fármaco-polímero utilizando microperlas, micropartículas o tecnología de nanoencapsulación con albúmina, liposomas, ferritina u otras proteínas y fosfolípidos biodegradables, antes de la aplicación sobre la endoprótesis recubierta con imprimador.

5 El agente bioactivo puede incluir un agente antineoplásico tal como trietilénfosforamida, un agente antiproliferativo, un agente antisentido, un agente antiplaquetario, un agente antitrombogénico, un anticoagulante, un antibiótico, un agente antiinflamatorio, un agente de terapia génica, un fármaco orgánico, un compuesto farmacéutico, un producto de ADN recombinante, un producto de ARN recombinante, un colágeno, un derivado de colágeno, una proteína, un análogo de proteína, un sacárido, un derivado de sacárido, o combinaciones de los
10 mismos.

El agente bioactivo puede ser cualquier sustancia terapéutica que proporcione una característica terapéutica para la prevención y el tratamiento de enfermedades o trastornos. Un agente antineoplásico puede prevenir, destruir o bloquear el crecimiento y la diseminación de células cancerosas en las proximidades de la endoprótesis. Un agente antiproliferativo puede prevenir o detener el crecimiento de las células. Un agente antisentido puede actuar a nivel genético para interrumpir el proceso mediante el cual se producen proteínas causantes de enfermedades. Un agente antiplaquetario puede actuar sobre las plaquetas de la sangre, inhibiendo su función en la coagulación de la sangre. Un agente antitrombogénico puede retardar activamente la formación de coágulos de sangre. Un anticoagulante puede retrasar o prevenir la coagulación de la sangre con el tratamiento con anticoagulantes, utilizando compuestos tales como heparina y cumarinas. Un antibiótico puede destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos y puede utilizarse para combatir enfermedades e infecciones. Se puede utilizar un agente antiinflamatorio para contrarrestar o reducir la inflamación en la proximidad de la endoprótesis. Un agente de terapia génica puede resultar apto para cambiar la expresión de los genes de una persona para tratar, curar o prevenir enfermedades. Un fármaco orgánico puede ser cualquier material terapéutico de molécula pequeña. Un compuesto farmacéutico puede ser cualquier compuesto que proporcione un efecto terapéutico. Un producto de ADN recombinante o un producto de ARN recombinante puede incluir material genético de ADN o ARN modificado. Los agentes bioactivos de valor farmacéutico asimismo pueden incluir colágeno y otras proteínas, sacáridos y sus derivados. Por ejemplo, el agente bioactivo puede seleccionarse para inhibir la reestenosis vascular, una afección que corresponde a un estrechamiento o constricción del diámetro de la luz corporal en la que se dispone la endoprótesis. El agente bioactivo puede controlar, en general, la proliferación celular. El control de la proliferación celular puede incluir mejorar o inhibir el crecimiento de células o tipos de células dirigidas.
15
20
25
30

El agente bioactivo puede ser un agente contra una o más afecciones, incluidas reestenosis coronaria, reestenosis cardiovascular, reestenosis angiográfica, arterioesclerosis, hiperplasia y otras enfermedades y afecciones. Por ejemplo, el agente bioactivo puede seleccionarse para inhibir o prevenir la reestenosis vascular, una afección que corresponde a un estrechamiento o constricción del diámetro de la luz corporal en la que se dispone la endoprótesis. El agente bioactivo puede controlar, en general, la proliferación celular. El control de la proliferación celular puede incluir mejorar o inhibir el crecimiento de células o tipos de células dirigidas.
35

El agente bioactivo puede incluir podofilotoxina, etopósido, camptotecina, un análogo de camptotecina, mitoxantrona, sirolimus y sus derivados o análogos. La podofilotoxina es un fármaco orgánico altamente tóxico que presenta propiedades antitumorales y puede inhibir la síntesis de ADN. El etopósido es un antineoplásico que puede derivarse de una forma semisintética de podofilotoxina para tratar la leucemia monoquística, el linfoma, el cáncer de pulmón de células pequeñas y el cáncer de testículo. La camptotecina es un fármaco contra el cáncer que puede actuar como un inhibidor de la topoisomerasa. Relacionado en estructura a la camptotecina, un análogo de la camptotecina, como la aminocamptotecina, se puede utilizar como un fármaco contra el cáncer. La mitoxantrona asimismo es un fármaco importante contra el cáncer, que se utiliza para tratar la leucemia, el linfoma y el cáncer de mama. El sirolimus es un medicamento que puede interferir con el ciclo de crecimiento celular normal y puede utilizarse para reducir la reestenosis. El agente bioactivo asimismo puede incluir análogos y derivados de estos agentes. Los antioxidantes pueden ser beneficiosos por derecho propio por sus propiedades contra la reestenosis y sus efectos terapéuticos.
40
45
50

El recubrimiento de fármaco-polímero puede ablandar, disolver o erosionar la endoprótesis para eluir por lo menos un agente bioactivo. Este mecanismo de elución puede referirse a la erosión de la superficie en la que la superficie exterior del recubrimiento de fármaco-polímero se disuelve, se degrada o es absorbida por el cuerpo; o erosión masiva en la que la mayor parte del recubrimiento de fármaco-polímero se biodegrada para liberar el agente bioactivo. Las partes erosionadas del recubrimiento de fármaco-polímero pueden ser absorbidas por el cuerpo, metabolizadas o expulsadas de otro modo.
55

El recubrimiento de fármaco-polímero asimismo puede incluir una matriz polimérica. Por ejemplo, la matriz polimérica puede incluir un polímero o copolímero basado en caprolactona, o varios polímeros cíclicos. La matriz polimérica puede incluir varias macromoléculas sintéticas y no sintéticas o de origen natural y sus derivados. El polímero se selecciona ventajosamente de entre el grupo que consiste en uno o más polímeros biodegradables en diversas combinaciones, tales como polímeros, copolímeros y polímeros de bloques. Algunos ejemplos de dichos polímeros biodegradables (asimismo biorreabsorbibles o asimismo bioabsorbibles) incluyen poliglicólidos, polilactidas, policaprolactonas, poli(sebacato de glicerol), policarbonatos, por ejemplo derivados de tirosina,
60
65

biopoliésteres tales como poli(β -hidroxialcanoatos) (PHA) y compuestos derivados, poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de butileno), polidioxanonas, híbridos, materiales compuestos, matrices de colágeno con moduladores del crecimiento, proteoglucanos, glucosaminoglucanos, SIS (submucosa intestinal pequeña) formada al vacío, fibras, quitina y dextrano. Cualquiera de estos polímeros biodegradables puede utilizarse solo o en combinación con estos u otros polímeros biodegradables en diversas composiciones. La matriz polimérica incluye preferentemente polímeros biodegradables tales como polilactida (PLA), polímero de poli(ácido glicólico) (PGA), poli(e-caprolactona) (PCL), poliacrilatos, polimetacrilatos u otros copolímeros. El fármaco farmacéutico se puede dispersar por toda la matriz polimérica. El fármaco farmacéutico o el agente bioactivo pueden difundirse desde la matriz polimérica para eluir el agente bioactivo. El fármaco farmacéutico puede difundirse desde la matriz polimérica en el biomaterial que rodea la endoprótesis. El agente bioactivo puede separarse de dentro del fármaco-polímero y difundirse desde la matriz polimérica en el biomaterial circundante. En una forma de realización adicional, la composición de recubrimiento de fármaco puede fabricarse utilizando el fármaco 42-Epi-(tetrazolil)-sirolimus, expuesto en la patente US nº 6.329.386 concedida a Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., y dispersarse dentro de un recubrimiento obtenido a partir de un recubrimiento de fosforilcolina de Biocompatibles Internacional P.L.C. expuesto en la patente US nº 5.648.442.

La matriz polimérica se puede seleccionar para proporcionar una tasa de elución deseada del agente bioactivo. Los fármacos pueden sintetizarse de forma que un agente bioactivo particular pueda tener dos tasas de elución diferentes. Un agente bioactivo con dos tasas de elución diferentes, por ejemplo, permitiría la administración rápida del fármaco farmacológicamente activo dentro de un periodo de veinticuatro horas a partir de la cirugía, con una administración más lenta y constante del fármaco, por ejemplo, durante los próximos dos a seis meses.

La capa biodegradable de cubierta superior

La DES puede comprender además una capa de cubierta superior, que se puede fabricar a partir de la misma composición que la capa de liberación de recubrimiento biodegradable. En particular, la capa biodegradable de cubierta superior puede incluir polímeros biodegradables tales como polilactida (PLA), polímero de poli(ácido glicólico) (PGA), poli(e-caprolactona) (PCL), poliacrilatos, polimetacrilatos u otros copolímeros.

Proceso de fabricación

El electroinjerto de polímeros es una técnica basada en la formación de una capa de polímero sobre una superficie *in situ*, es decir, a partir de un baño de precursores en lugar de a partir de un polímero prefabricado. La superficie que se va a recubrir está polarizada eléctricamente, y actúa como un iniciador de polimerización que provoca la polimerización de la superficie por medio de reacciones en cadena de propagación (ver el documento FR2821575). Las endoprótesis de la presente invención se preparan según un modo de operación en el que es posible realizar fácilmente un electroinjerto real de un polímero a partir de soluciones de precursores que son fáciles de preparar y controlar, en particular debido a:

- (i) un protocolo de aplicación del potencial de electrodo que fuerza la reacción de injerto;
- (ii) el uso de un medio electrolítico que sea por lo menos un buen agente de hinchamiento del polímero formado, o incluso un buen disolvente de dicho polímero.

Se puede obtener una película adherente de material biocompatible poli(metacrilato de butilo) (p-BuMA) mediante barrido voltamétrico de una endoprótesis (acero inoxidable, aleaciones de cobalto-cromo, etc.) en una solución que contenga una sal de diazonio (especialmente una sal de arildiazonio, tal como tetrafluoroborato de 4-nitrobencenodiazonio) en una concentración de $5 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-1} mol/l (especialmente 10^{-2} mol/l) y el monómero (p-BuMA a 3.5 mol/l) (disolvente = DMF), en un intervalo de potencial de -0.2 V/ECS a -3.0 V/ECS a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

La solución electrolítica puede incluir un disolvente principalmente espectador (es decir, que no interviene en la reacción de electropolimerización) destinado a solubilizar los monómeros polimerizables en cadena. No obstante, el o los monómeros pueden desempeñar el papel del disolvente, haciendo que la presencia de dicho líquido no siempre sea necesaria. Cuando se utilizan, estos disolventes se seleccionan preferentemente de entre la dimetilformamida, el dimetilsulfóxido, el acetato de etilo, el acetonitrilo, el tetrahidrofurano, el carbonato de propileno y otros disolventes utilizados habitualmente en electroquímica, dicloroetano y, más en general, disolventes clorados. El disolvente asimismo se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en agua y alcoholes. No es necesario someter los disolventes a destilación previa para eliminar el agua que contienen, ni llevar a cabo un control riguroso del contenido de agua de la atmósfera por encima del medio de reacción. Por lo tanto, el proceso se puede implementar fácilmente a escala industrial.

La solución electrolítica asimismo puede contener por lo menos un electrolito de soporte para asegurar y/o mejorar el paso de la corriente en la solución electrolítica. Cuando se utilizan, los electrolitos de soporte se seleccionan preferentemente de entre sales de amonio cuaternario tales como percloratos, tosilatos, tetrafluoroboratos, hexafluorofosfatos, haluros de amonio cuaternarios, nitrato de sodio y cloruro de sodio. La solución electrolítica

puede comprender además un agente para mejorar la homogeneidad de la película (un tensioactivo), tal como glicerol.

5 Esta película presenta poca reticulación, si es que presenta alguna, y su adhesión a la superficie es el resultado de la formación de enlaces con el metal subyacente. Por esta razón, se utiliza el término electroinjerto del polímero a continuación, aunque a continuación se refiere a un injerto que se obtiene mediante la electroreducción de una solución que contiene tanto un monómero que puede experimentar una reacción en cadena de propagación como de una sal de diazonio, encontrándose esta última preferentemente a una concentración reducida. Dicho proceso permite el electroinjerto, en todos los sustratos conductores tales como endoprótesis de películas orgánicas, y en particular polímeros, que tienen un espesor comprendido entre unas pocas decenas de nanómetros y unos pocos cientos de nanómetros.

15 La solución electroinjertada dispuesta sobre el armazón de la endoprótesis se seca. El exceso de líquido puede eliminarse por soplado antes de secar la película. El secado de la solución polimérica para eliminar o retirar cualquier componente volátil se puede realizar a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas en atmósfera de nitrógeno seco u otro entorno adecuado, incluido un entorno de vacío. La endoprótesis recubierta puede hornearse durante ~60 min a temperaturas moderadamente elevadas del orden de 40°C al vacío (~10 mbar) para eliminar cualquier disolvente atrapado dentro del recubrimiento de imprimación. El espesor del recubrimiento de imprimación electroinjertado puede variar entre 10 nm y 1.0 micra para recubrir adecuadamente el armazón de la endoprótesis y proporcionar una capa subyacente satisfactoria para la aplicación subsiguiente de fármaco-polímero. Se pueden incluir unas etapas adicionales de aplicación y secado para alcanzar el espesor deseado del recubrimiento de imprimación.

20 Sobre el recubrimiento de imprimación electroinjertado, se aplica un proceso en húmedo por pulverización o por inmersión. El fármaco-polímero se puede mezclar en un disolvente adecuado y aplicarse sobre la imprimación utilizando una técnica de aplicación tal como inmersión, pulverización, aplicación con brocha o con cepillo. Durante la operación de recubrimiento, el fármaco-polímero se adhiere bien al recubrimiento de imprimación electroinjertado. El recubrimiento de fármaco-polímero se puede aplicar inmediatamente después de aplicar el recubrimiento de imprimación electroinjertado. Alternativamente, los recubrimientos de fármaco-polímero se pueden aplicar a una endoprótesis con el recubrimiento de imprimación electroinjertado en un momento posterior.

25 Un fármaco-polímero puede mezclarse con un disolvente adecuado para formar una solución polimérica. El fármaco-polímero puede incluir una matriz polimérica y uno o más compuestos terapéuticos. Para formar un recubrimiento de fármaco-polímero, un monómero tal como un derivado de acetato de vinilo se puede mezclar con otros monómeros en un disolvente tal como alcohol isopropílico para formar una solución polimérica. La mezcla se puede hacer reaccionar para formar un polímero, y uno o más agentes bioactivos se pueden mezclar con la mezcla polimerizada para formar un fármaco-polímero con una tasa de elución predefinida. Un agente bioactivo adecuado o una solución que contenga el agente bioactivo se puede mezclar con la solución polimérica. Alternativamente, un polímero tal como un copoliéster o copolímero de bloque puede disolverse en un disolvente adecuado, y se pueden añadir uno o más agentes bioactivos a la mezcla. La mezcla se puede combinar con un promotor de la adhesión en la solución polimérica. Se pueden seleccionar uno o más promotores de la adhesión y añadirlos a la mezcla.

30 La solución polimérica se puede aplicar al armazón de la endoprótesis con el recubrimiento de imprimación electroinjertado. La solución polimérica se puede aplicar a la endoprótesis utilizando cualquier procedimiento adecuado para aplicar la solución de polímero.

35 El exceso de líquido puede eliminarse por soplado y la solución polimérica se puede secar. El secado de la solución polimérica para eliminar o retirar cualquier componente volátil se puede realizar a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas (~40°C) en atmósfera de nitrógeno seco u otro entorno adecuado. Se puede utilizar una segunda etapa de inmersión y secado para lograr más espesor de recubrimiento. El espesor del recubrimiento de fármaco-polímero puede estar comprendido entre 1.0 micra y **200 micras** o más para proporcionar un beneficio farmacológico suficiente y satisfactorio con el agente bioactivo.

40 El tratamiento del recubrimiento de fármaco-polímero puede incluir el secado al aire o el calentamiento a baja temperatura en aire, nitrógeno u otro entorno controlado. El recubrimiento de fármaco-polímero se puede tratar calentando el recubrimiento de fármaco-polímero a una temperatura predeterminada.

45 Más específicamente, se proporcionan en la presente memoria unos ejemplos ilustrativos de la presente invención.

50 Los siguientes ejemplos ilustran:

55 (1) una formulación de solución electroinjertada

60 (2) un proceso de electroinjerto sobre endoprótesis de acero inoxidable

- (3) un proceso de electroinjerto sobre endoprótesis de cobalto-cromo
- (4) el efecto barrera frente a la corrosión de p-BuMA electroinjertado
- 5 (5) unas propiedades de barrera frente a la corrosión de los cupones recubiertos por inmersión con PLA y p-BuMA electroinjertado
- (6) un proceso de pulverización para la deposición de la capa de depósito
- 10 (7) la mejora de la adherencia por medio de la capa electroinjertada
- (8) unos ejemplos de cinética de liberación de fármacos *in vitro*
- (9) un estudio de citotoxicidad de recubrimientos electroinjertados
- 15 (10) un estudio de hemólisis de recubrimientos electroinjertados
- (11) un estudio de tolerancia local de endoprótesis electroinjertadas después de su implantación local
- 20 (12) un rendimiento de la recolonización de endoprótesis recubiertas con BuMA electroinjertado en comparación con BMS, modelo de conejo a los 14 y 28 días;
- (13) una tolerancia local tras endoprótesis totalmente recubierta en cerdos.
- 25 (14) un sistema de pulverización de baja presión para la fabricación de DES con una buena interfaz con capas electroinjertadas.

Ejemplo 1: Formulación de solución de electroinjerto

30 Una forma de realización de la presente invención se muestra mediante la formulación de una solución de electroinjerto basada en un monómero vinílico de n-butilmetacrilato (BuMA) disuelto en un disolvente de DMF. Se utiliza NaNO₃ como soporte electrolítico.

Tabla 1: formulación de solución de electroinjerto

35

Concentración de monómero vinílico	Concentración de tetrafluoroborato de diazoNO ₂	Concentración de NaNO ₃	Glicerol	% de DMF
30%	10 ⁻³ M	2,5 · 10 ⁻² M	5%	65%

Ejemplo 2: Proceso de electroinjerto en endoprótesis de acero inoxidable

40 Utilizando la solución química descrita en el ejemplo 1, se recubrió una endoprótesis coronaria de acero inoxidable de 18 mm (ClearStream Technologies) con p-BuMA electroinjertado con los parámetros siguientes, se enjuagó y se secó durante 60 minutos a 40°C a un vacío de 10 mbar. Utilizando ese procedimiento, el espesor de recubrimiento obtenido es de aproximadamente 150 nm.

Parámetros de electroinjerto:

45 Procedimiento: voltametría cíclica de potencial de circuito abierto a -3,2 V/EC con burbujeo de argón (2 lmin⁻¹).
 Número de barridos: 50 barridos
 Velocidad de barrido: 50 mV/s.

Ejemplo 3: Proceso de electroinjerto en endoprótesis de cobalto-cromo

50 Utilizando la solución química descrita en el ejemplo 1, una endoprótesis coronaria de cobalto-cromo de 18 mm (Natec-medical) se electroinjertó con p-BuMA con los parámetros siguientes, se enjuagó y se secó durante 60 minutos a 40°C a un vacío de 10 mbar. Antes del electroinjerto, la superficie de la endoprótesis se trata con una solución de NH₄F al 40% durante 1 minuto. Utilizando ese procedimiento, el espesor de recubrimiento obtenido es de aproximadamente 150 nm.

Parámetros de electroinjerto:

60 Procedimiento: voltametría cíclica de potencial de circuito abierto a -3,5 V/CE con burbujeo de argón (2 lmin⁻¹).
 Número de barridos: 50 barridos
 Velocidad de barrido: 50 mV/s.

Ejemplo 4: Propiedades de barrera frente a la corrosión de p-BuMA electroinjertado

El potencial anticorrosivo de p-BuMA electroinjertado se evalúa en cupones recubiertos de acero inoxidable sintetizados según el protocolo descrito en el ejemplo 2.

Para este propósito, se sumergen unos cupones recubiertos con p-BuMA electroinjertado (ensayo) y cupones no recubiertos (control) en una solución de NaCl, a 9 g/l según una relación área superficial/volumen de 1 cm²/ml. Las muestras se mantienen a 37°C con agitación suave y el transcurso temporal de liberación de iones de cobalto, níquel y molibdeno se evalúa mediante un muestreo regular del medio de liberación. Los iones se cuantifican utilizando un plasma de acoplamiento inductivo - espectrómetro de masas (ICP-MS).

Tabla 2: liberación de iones

	Liberación de iones (ng/cm ²) en una solución de 9 g/l de NaCl a 37°C durante 150 días		
	Ni	Cr	Mo
BMS 316	28	12	8
p-BUMA (150 nm) en BMS 316L	3	7	1

La liberación de iones de la superficie metálica se reduce significativamente por el recubrimiento de p-BuMA electroinjertado, por ejemplo, el níquel liberado (que es, con mucho, el elemento más tóxico) disminuye de 28 ng/cm² para los cupones de acero inoxidable a 3 ng/cm² para los cupones de p-BuMA electroinjertado.

Ejemplo 5: propiedades de barrera frente a la corrosión de los cupones recubiertos por inmersión con PLA y p-BuMA electroinjertado

Se recubren por inmersión cupones con p-BuMA electroinjertado de acero inoxidable en una solución de polilactida (p-PLA) (5% p/v en cloroformo) que contiene o no 20% (p/p) de un fármaco modelo, pentoxifilina. Después de la inmersión, los recubrimientos se estabilizan a temperatura ambiente durante 24 horas y se secan en un horno a 40°C durante 48 horas. La liberación de iones se realiza según el protocolo descrito en el ejemplo 3. Una comparación de la liberación de iones Cr (A), Ni (B) y Mo (C) a partir de 316 cupones de acero inoxidable, recubiertos por inmersión con p-BuMA electroinjertado + p-PLA y cupones recubiertos por inmersión con p-BuMA electroinjertado + p-PLA que contienen pentoxifilina, en solución de NaCl (9 g/l) a 37°C durante 150 días se proporciona en la tabla 3 siguiente:

Tabla 3

	Liberación de iones a los 150 días (ng/cm ²)		
	Cr	Ni	Mo
Inox	18	30	8
Inox + PLA	6	8	1
Inox + PLA + PTX	4	7	1

La misma disminución de la liberación de iones se observa en los cupones de acero inoxidable recubiertos con el recubrimiento de doble capa, la cantidad de iones de Ni disminuye drásticamente de 30 ng/cm² a aproximadamente 8 ng/cm² así como la cantidad de iones Cr, que disminuye de 18 ng/cm² a 6 ng/cm² y 4 ng/cm² respectivamente, para el recubrimiento p-BuMA electroinjertado/p-PLA y el recubrimiento p-BuMA electroinjertado/PLA/pentoxifilina.

Ejemplo 6: proceso de recubrimiento por pulverización

Un proceso de recubrimiento por pulverización para disponer un recubrimiento de polímero de depósito sobre una endoprótesis metálica electroinjertada muestra otra forma de realización de la presente invención. Después del secado, una endoprótesis electroinjertada de 18 milímetros se reviste por pulverización con poliéster biodegradable (polilactida-co-glicolida 50/50, PLGA) que contiene sirolimus.

El copolímero (0.25% p/v) se disuelve en cloroformo. El sirolimus se disuelve después en la mezcla de cloroformo/polímero para obtener una relación final de sirolimus/polímero del 30% (p/p). La mezcla se aplica a la endoprótesis con p-BuMA electroinjertado, montada en un mandril giratorio, mediante pulverización con una boquilla fina con los parámetros siguientes:

Tabla 4: parámetros de pulverización

Flujo de pulverización (μl/s)	24
Volumen de pulverización (μl)	192
Presión (bar)	0.3

Velocidad de rotación de la endoprótesis (rpm)	2000
Distancia boquilla/endoprótesis (mm)	6.5
Número de ejecuciones de pulverización	50

El recubrimiento de dos capas se aplica a los lados luminal y abluminal de la endoprótesis de acero inoxidable, con un espesor más elevado (y ajustable) en la superficie abluminal con respecto a la superficie luminal. El secado a 40°C se realiza en un horno de vacío. Usando los parámetros anteriores, el recubrimiento de la endoprótesis pesa 800 +/- 80 µg, y el espesor del recubrimiento es de aproximadamente 5 a 7 µm. La carga de fármaco es de 164 +/- 16 µg.

Ejemplo 7: mejora de la adherencia del polímero de depósito mediante una capa subyacente de p-BuMA electroinjertado; un ensayo funcional

Se realiza un ensayo de adhesión para resaltar la fuerza de adhesión de la capa de polímero de depósito en la endoprótesis preelectroinjertada. El recubrimiento de doble capa sobre endoprótesis de acero inoxidable (18 mm, Clearstream Technologies) se realiza según los ejemplos 1 y 6.

El ensayo se realiza para simular la abrasión que podría experimentar un recubrimiento durante la implantación. Para ese propósito, la endoprótesis recubierta se hace pasar varias veces a través de un tubo de silicona que imita una arteria coronaria, después de lo cual se despliega la endoprótesis. Después del ensayo se realiza una inspección con microscopio óptico y electrónico de las endoprótesis.

No se observa deslaminación del recubrimiento para las endoprótesis electroinjertadas con imprimación: las 10 endoprótesis recubiertas electroinjertadas superan el ensayo de abrasión de lesión simulada, mientras que las endoprótesis recubiertas con pulverización sin el imprimador p-BuMA electroinjertado presentan una deslaminación grave.

Ejemplo 8: estudio de liberación de fármaco *in vitro*

En esta forma de realización, el transcurso temporal de liberación de sirolimus a partir de una endoprótesis recubierta de doble capa se logra según el protocolo siguiente:

Se recubren endoprótesis de acero inoxidable de 18 mm según los protocolos proporcionados en el ejemplo 1 para el p-BuMA electroinjertado y en el ejemplo 5 para el recubrimiento de pulverización de polímero biodegradable. Cada endoprótesis recubierta se sumerge en un vial que contiene 1 ml de una solución de liberación (99% de tampón de fosfato 0.01 M, pH = 7.4/1% de Tween 20) y se mantiene a 37°C con agitación suave. El medio de liberación se retira regularmente y se reemplaza por uno nuevo. La absorbancia (unidades arbitrarias) se mide utilizando un espectrofotómetro Hitachi 3 a una longitud de onda $\lambda = 278$ nm frente al medio de liberación.

La concentración de sirolimus se determina, por triplicado, utilizando una curva de calibración.

Las figuras 1 (A) y 1 (B) ilustran respectivamente una liberación rápida (A) y una liberación lenta (B) de sirolimus a partir de un recubrimiento de doble capa *in vitro* (liberación acumulada (%) frente al tiempo (días)). Para la liberación rápida, la capa de depósito es un copolímero (50/50) de lactida y glicolida, PLGA (120 000 g/mol), mientras que para la liberación lenta, el polímero biodegradable es una poli(lactida) (30 000 g/mol).

La diferencia en la cinética de liberación del fármaco está directamente relacionada con la velocidad de degradación de la capa de depósito biodegradable. Dado que el polímero PLGA 50/50 se degrada más rápido que la PLA.

Los perfiles correspondientes *in vivo*, obtenidos de la medición del fármaco residual en las endoprótesis explantadas de conejos NZ en un modelo iliofemoral, se muestran en la figura 2 (liberación fraccionada a lo largo del tiempo (días):

el perfil + es el de PLGA
el perfil x es el de PLA.

El fármaco liberado (sirolimus) y la carga fueron los mismos en los dos casos.

Esta figura representa que el fármaco está totalmente liberado y el polímero de liberación ha desaparecido por completo a los 28 días para la liberación rápida (PLGA), mientras que el fármaco liberado es solo de 60% a los 28 días con PLA, que se cree que desaparece en un periodo de 2 meses.

Ejemplo 9: Estudio de citotoxicidad de recubrimientos electroinjertados

Se lleva a cabo un estudio de citotoxicidad potencial de los recubrimientos electroinjertados según la norma ISO 10993-5.

El estudio pretende evaluar cualitativa y cuantitativamente la citotoxicidad del p-BuMA *electroinjertado* sometido a ensayo como un extracto, después de la aplicación a células sembradas en una microplaca de 96 pocillos.

5 La extracción se realizó por triplicado con medio de cultivo (DMEM) que contenía suero de ternera fetal, en recipientes estériles, cerrados, químicamente inertes durante 96 horas a 37°C. La relación entre el área superficial de p-BuMA electroinjertado y el volumen del vehículo de extracción fue igual a 3 cm²/ml.

10 El extracto y sus diluciones (50% y 10%) se dispusieron sobre las células y se dejaron en contacto durante por lo menos 24 horas. La citotoxicidad se determinó mediante un colorante vital, el rojo neutro.

Los medios de determinación retenidos fueron la morfología general de la célula (evaluación cualitativa) y el porcentaje de viabilidad celular (evaluación cuantitativa) sobre la base de que la absorbancia obtenida mediante lectura a 540 nm es proporcional al número de células vivas (análisis cuantitativo).

15 Control positivo: el control se realizó para cada ensayo con un producto que proporcionó un efecto citotóxico reproducible en las condiciones del ensayo: una solución de fenol a 3.2 g/l en medio de cultivo (DMEM). El ensayo fue positivo si el porcentaje de mortalidad era de aproximadamente 100%.

20 Control negativo: el control se realiza con un material (polietileno de alta densidad) que no produjo ningún efecto citotóxico en las condiciones del ensayo. El ensayo fue positivo si el porcentaje de viabilidad celular era de 100%.

Tabla 5: Evaluación cualitativa y cuantitativa de la citotoxicidad del imprimador p-BuMA electroinjertado

Muestras		Evaluación cualitativa	Absorbancia a 540 nm	% de viabilidad	% de muerte
Control DMEM		Todas las celdas están coloreadas por rojo neutro	0.495 ± 0.016	100%	0%
Disolvente de extracción		Todas las celdas están coloreadas por rojo neutro	0.521 ± 0.028	100%	0%
Extracto 1	100%	Todas las celdas están coloreadas por rojo neutro	0.514 ± 0.019	100%	0%
	50%		0.520 ± 0.007	100%	0%
	10%		0.511 ± 0.030	100%	0%
Extracto 2	100%	Todas las celdas están coloreadas por rojo neutro	0.497 ± 0.012	100%	0%
	50%		0.507 ± 0.028	100%	0%
	10		0.517 ± 0.013	100%	0%
Extracto 3	100%	Todas las celdas están coloreadas por rojo neutro	0.501 ± 0.036	100%	0%
	50%		0.505 ± 0.041	100%	0%
	10		0.506 ± 0.023	100%	0%
Control negativo		Todas las celdas están coloreadas por rojo neutro	0.479 ± 0.012	97%	3%
Control positivo		Las células no incorporan el rojo neutro	0.007 ± 0.002	1%	99%

25 El ensayo realizado en los extractos de recubrimiento de imprimación electroinjertado no muestra evidencias de toxicidad celular después de veinticuatro horas.

Ejemplo 10: Estudio de hemólisis; ensayos de contacto directo

30 La hemólisis, en este ejemplo, se refiere a la degradación de glóbulos rojos en contacto directo con recubrimientos electroinjertados. El estudio de hemólisis se realiza en cupones de acero inoxidable de 1 cm² con P-BuMA electroinjertado y esterilizados según las normas ISO 10 993-4 y ASTM F 756-93.

35 Reparación de sustratos de sangre humana: La sangre humana anticoagulada con citrato se obtiene en condiciones estériles de tres donantes. La sangre se utiliza dentro de un periodo de 1 hora.

Dilución de los sustratos sanguíneos: La concentración de hemoglobina de cada sangre se evaluó y fue de 97.95 ± 8.32 a 111.86 ± 3.90 a 91.05 ± 0.94 mg/ml.

40 La hemoglobina plasmática libre debe ser inferior a 1 mg/ml (0.30-0.32-0.28 mg/ml).

El contenido total de hemoglobina de cada muestra de sangre se ajusta a 25.01 ± 2.5 mg/ml diluyendo con una cantidad apropiada de solución salina normal (25.66 ± 0.05 mg/ml-26.19 ± 1 mg/ml - 25.37 ± 0.69 mg/ml).

45 Determinación de hemoglobina:

Hemoglobina en sangre: se mezclan 20 µl de sangre con 5 ml de reactivo de Drabkin (Sigma-525-2) (15 minutos).

La absorbancia (unidades arbitrarias) se mide utilizando un espectrofotómetro a $\lambda = 540$ nm. La concentración de hemoglobina se determina utilizando una curva de calibración de 0.036 a 0.72 mg/ml preparada utilizando un patrón de referencia (patrón de hemoglobina, Sigma-525-18).

5 Hemoglobina plasmática: se mezclan 100 μ l de plasma con 5 ml de reactivo de Drabkin en un tubo de hemólisis (15 minutos). La absorbancia (unidades arbitrarias) se mide utilizando un espectrofotómetro (Kontron) a una longitud de onda $\lambda = 540$ nm frente el reactivo de Drabkin.

10 La concentración de hemoglobina se determina por triplicado utilizando una curva de calibración de 0.036 a 0.720 mg/ml, preparada utilizando un patrón de referencia (patrón de hemoglobina, Sigma-525-18).

Ensayos estáticos:

15 En condiciones estériles, 5 ml de cada uno de los sustratos de sangre se transfieren a tubos de ensayo de tapón de rosca que contienen el material de ensayo. La relación entre el área superficial de las muestras de material de ensayo y el volumen de los sustratos sanguíneos es de 3 cm^2/ml . El control positivo está constituido por 200 μ l de sustrato sanguíneo suplementado con 10 ml de agua.

20 El control negativo está constituido por sustrato sanguíneo solo.

Los tubos se tapan y se mantienen fijos en un bastidor de tubos de ensayo adecuado durante 4 horas a 37°C. Al final del tiempo de incubación especificado, todos los tubos se centrifugan (100xG, 15 min). Cada fracción de plasma exento de células sobrenadantes se transfiere a un tubo de 15 ml (polipropileno, estéril) y se centrifuga (700xG, 5 min). Los sobrenadantes se retiran cuidadosamente para el análisis de hemoglobina subsiguiente.

25 Determinación de hemoglobina: 1 ml de sobrenadante se mezcla con 3 ml de reactivo de Drabkin. La absorbancia se mide a $\lambda = 540$ nm. Se prepara una curva de calibración de 0.03 a 0.72 mg/ml utilizando un patrón de referencia (patrón de hemoglobina, Sigma-525-18).

30 La concentración de hemoglobina en plasma se determina en cada sobrenadante utilizando la curva de calibración.

El índice hemolítico (HI) se calcula según la fórmula siguiente:

$$\text{HI}(\%) = (\text{hemoglobina libre en el sobrenadante} / \text{hemoglobina total presente en el sustrato sanguíneo}) \times 100$$

35 La tabla 6 presenta el nivel de hemoglobina en los sobrenadantes y la tabla 7 proporciona el índice hemolítico (HI) correspondiente. El HI promedio obtenido para el control negativo con 3 sangres, evaluado por triplicado, es de $0.35 \pm 0.04\%$. El promedio de HI en presencia del imprimador p-BuMA utilizando 3 sangres, evaluado por triplicado, es de $0.29 \pm 0.03\%$.

40 Tabla 6: Nivel de hemoglobina en los sobrenadantes

Hemoglobina (mg/ml)			
S1 (sustrato)	Control positivo	Control negativo	muestras de p-BuMA electroinjertado
25.66 \pm 0.05	26.60 \pm 0.11	0.09 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01
S2 (sustrato)	Control positivo	Control negativo	muestras de p-BuMA electroinjertado
26.19 \pm 1.00	26.72 \pm 0.18	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.00
S3 (sustrato)	Control positivo	Control negativo	muestras de p-BuMA electroinjertado
25.37 \pm 0.69	25.79 \pm 0.33	0.10 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01

Tabla 7: Índice hemolítico

Índice hemolítico (IH)			
S1 (sustrato)	Control positivo	Control negativo	muestras de p-BuMA electroinjertado
	103.68 \pm 0.43	0.35 \pm 0.04	0.25 \pm 0.04
S2 (sustrato)	Control positivo	Control negativo	muestras de p-BuMA electroinjertado
	102.01 \pm 0.67	0.31 \pm 0.05	0.31 \pm 0.00
S3 (sustrato)	Control positivo	Control negativo	muestras de p-BuMA electroinjertado
	101.67 \pm 1.30	0.39 \pm 0.03	0.31 \pm 0.03

Los resultados indican que las muestras recubiertas electroinjertadas no presentan propiedades hemolíticas en contacto directo.

5 Ejemplo 11: tolerancia local después de la implantación de una endoprótesis electroinjertada en conejos

El objetivo de este estudio fue evaluar la tolerancia local de una endoprótesis de p-BuMA electroinjertado en comparación con una endoprótesis metálica sin recubrimiento. Las endoprótesis recubiertas electroinjertadas (acero inoxidable, 18 mm de longitud) se recubren según el protocolo proporcionado en el ejemplo 2 y se esterilizan con óxido de etileno utilizando un protocolo estándar validado (43°C, 50% de humedad relativa).

Procedimiento experimental

15 1- Sitio de implantación

Cada animal se implantó en el sitio de la arteria ilíaca derecha y/o izquierda con la endoprótesis recubierta o no recubierta durante 4 semanas.

20 2- Preparación de animales y anestesia

Los conejos se premedicaron con atropina (atropinum sulfuricum, AGUETTANT, Francia), se anestesiaron con 25 mg/kg de tiletamina-zolazepam (Zoletil® 100, VIRBAC, Francia) y 5 mg/kg de xilazina (Rompun® 2% BAYER AG, Alemania), por vía intramuscular según el procedimiento estándar interno. Los sitios quirúrgicos se cortaron exentos de pelo, se lavaron con un jabón germicida (Vetedine® savon, VETOQUINOL, Francia) y se desinfectaron con povidona yodada (solución de Vetedine®, VETOQUINOL, Francia).

Se administró el tratamiento siguiente en la arteria femoral a través del introductor antes de la implantación de cada endoprótesis:

30 Aspegic® (SYNTHELABO, Francia), 50 mg.
Heparine Choay® (SYNTHELABO, Francia), 50 UI.

Además, antes de cada angiografía, se administró el siguiente tratamiento vasodilatador en la arteria femoral:

35 Corvasal® (linsidomina, 0.06 mg, AVENTIS, Francia).

3- Angiografía previa al procedimiento

40 Se dejó al descubierto una arteria carótida y se introdujo una vaina introductora de 5 o 6 Fr. Se hizo avanzar un catéter guía 5 o 6 y un alambre guía (GW) a través de la vaina hasta la aorta terminal. Se realizó un mapeo angiográfico del árbol vascular ilíaco mediante inyección de material de contraste (Hexabrix® 320, Laboratoires GUERBET, Francia) con el equipo Philips BV212. Se registró el diámetro de cada arteria. El sobreestiramiento objetivo después de la implantación de la endoprótesis fue de aproximadamente 1.2.

45 4- Colocación de la endoprótesis

La endoprótesis se implantó en las arterias ilíacas (1 o 2 endoprótesis por animal) según el siguiente procedimiento:

- 50 - Inserción de un catéter guía (GC) y GW en el sitio objetivo.
- Retracción total del GW.
- Inserción del sistema de despliegue de endoprótesis en el sitio objetivo.
- Despliegue de la endoprótesis bajo una presión de globo definida (= 8 atmósferas).
- Implantación de la endoprótesis en la arteria ilíaca común.
- 55 - Retirada del sistema de administración del GC.

5- Angiografía postoperatoria

Se realizó una evaluación inmediata de la permeabilidad de las arterias implantadas mediante angiografía. Se registró el diámetro de cada arteria y se calculó el sobreestiramiento obtenido.

60 6- Tratamiento farmacológico y periodo de observación

Los animales se observaron diariamente para detectar cualquier anomalía clínica. El tratamiento anticoagulante comenzó un día antes del procedimiento de implantación y se administró diariamente durante 30 días: Aspegic® (aspirina 100 mg/ml, SYNTHELABO, Francia), vía intramuscular, 50 mg/día.

7- Sacrificio y toma de muestras

Los animales se sacrificaron mediante inyección letal de barbiturato (DolethalND, Laboratoires VETOQUINOL, Francia). Se realizó un examen general de la superficie externa de las arterias implantadas: se observó y registró cualquier criterio de intolerancia local (inflamación, necrosis, hemorragia o cualquier otra lesión). Se realizaron fotografías macroscópicas. Las muestras se identificaron y se fijaron en solución de formalina tamponada al 10% para la histopatología.

8- Preparación de muestras histopatológicas

Los sitios implantados se deshidrataron en soluciones alcohólicas de concentraciones crecientes y se embebieron en PMMA (poli(metacrilato de metilo)). Se obtuvo una sección distal por medio de una técnica de microcorte y molido adaptada de Donath (Donath K., Brunner G.: A method for the study of undecalcified bone and teeth with attached soft tissues. J. Oral. Pathol., 11; 318-326, 1982). La sección se tiñó con tinción de Paragon modificada para el análisis cualitativo y cuantitativo.

9- Interpretación

Los portaobjetos histológicos se examinaron bajo microscopía óptica (NIKON Eclipse E600, equipado con lentes x4, x10, x20 y x40, acoplado a una cámara digital DN 100 NIKON). Se realizó una evaluación histológica semicuantitativa según la norma ISO 10993-6. Se prestó especial atención a la presencia de tejido fibroso, fibrina, fenómenos degenerativos, necrosis, células del músculo liso, distensión de la lámina elástica, células inflamatorias y degradación del material y presencia de trombos.

Se realizaron micrografías histológicas. Cada parámetro se calificó según la escala de calificación siguiente:

- 0: ausente
- 1: limitado
- 2: moderado
- 3: marcado
- 4: grave

Estos parámetros permitieron una evaluación precisa de cualquier inflamación, reacción a cuerpo extraño y reacción inmunitaria. La formación neointimal se evaluó cualitativamente.

Resultados

1- Análisis histopatológico

El análisis semicuantitativo se presenta en la tabla 8.

2- Observaciones generales

Los puntales de la endoprótesis mostraron una forma cuadrada con ángulos redondeados. No se observó alteración microscópica del material de la endoprótesis en las muestras.

3- Endoprótesis no recubiertas (artículo de control)

Todas las endoprótesis se desplegaron completamente y se integraron bien en la pared vascular. El armazón de la endoprótesis se integró en un tejido neointimal de espesor moderado que contenía un número moderado de células musculares lisas, fibrocitos y una infiltración limitada de macrófagos. Una muestra (animal nº 3 a la derecha) mostró una ruptura limitada de la lámina elástica sin protrusión medial. Se sospechó de la presencia de una cantidad limitada de sustancia proteoglicano en el tejido neointimal de una muestra (animal nº 11 a la izquierda). No se observó ningún trombo.

4- Endoprótesis recubiertas (artículo de ensayo)

El espesor de la capa neointimal fibromuscular que cubre el armazón de la endoprótesis fue comparable o ligeramente más fino que en el grupo de referencia. Este hallazgo se obtuvo por comparación intraanimal. Debido al número limitado de muestras y observaciones evaluables, no se pueden extraer conclusiones sobre la importancia biológica de los hallazgos. La reacción macrofágica fue de una magnitud reducida similar al grupo de referencia. No se observó ningún trombo.

Un total de 10 de los 14 animales se implantaron con éxito con la endoprótesis recubierta (artículo de ensayo) y/o la endoprótesis sin recubrimiento (artículo de control). El sobreestiramiento de la arteria después de la colocación de la endoprótesis alcanzó aproximadamente 1.1 a 1.4 veces el diámetro inicial de la arteria en este estudio.

Después de 1 mes de implantación, no se identificaron lesiones macroscópicas visibles (necrosis, inflamación, hemorragia) en las muestras recuperadas de los 8 animales supervivientes (n = 6 endoprótesis no recubiertas; n = 7 endoprótesis recubiertas). No se observaron signos de oclusión en el sacrificio.

Dispositivo implantado	Nº de animal	Sitio ilíaco	Distensión de lámina elástica	Trombo mural	Depósito de fibrina	Necrosis	Degeneración tisular	Células polimorfo-nucleares (PMN)	Linfocitos	Células plasmáticas	Macrófagos	Células gigantes	Fibroцитos	Proliferación neointimal	Células musculares lisas	Integración	Protrusión de la pared arterial
Ensayo	1	I	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	2	D	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	2	2*	2	4	0
	3	I	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	4	D	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
	11	I	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
	12	D	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	2	2	4	0
	14	D	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
		M		0	0	0	0	0	0	0	0	1.3	0.	1.	1.6	1.	4.
Control	3	D	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	4	I	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
	7	D	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	4	0
	11	D	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	12	I	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
	14	I	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2	2	4	0
		M	2.2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1.	1.7	1.	4.	0

Tabla 8: Análisis histopatológico semicuantitativo

D = derecha; I = izquierda, M = media

5 Resultados de las secciones histológicas de la endoprótesis recuperada del conejo después de 1 mes de implantación: ningún signo de reacción de intolerancia local para todas las series de endoprótesis de ensayo o de control y resultados comparables en términos de estenosis con la presencia de una proliferación neointimal fibromuscular leve.

10 Conclusiones

Los principales hallazgos histopatológicos fueron los siguientes:

- 15
- Todas las endoprótesis de ensayo y control se desplegaron completamente y se integraron bien en la pared vascular sin trombo.
 - Después de un mes de implantación, no se observaron signos de reacción de intolerancia local para todas las series de ensayo o de control.

- La serie de endoprótesis de ensayo y de control mostró resultados comparables en términos de estenosis con la presencia de una proliferación neointimal fibromuscular leve.

5 Además, las capas electroinjertadas resultan aptas para prevenir el agrietamiento y la deslaminación de las capas de polímeros biodegradables, y muestran una recolonización igual o mejor que las endoprótesis vasculares de acero inoxidable en el modelo de conejo (norma ISO 10993).

10 **Ejemplo 12: recolonización a los 14 y 28 días en conejos sobre endoprótesis electroinjertadas con p-BuMA en comparación con BMS**

15 Se recubrieron endoprótesis de cobalto-cromo con una capa de p-BuMA electroinjertado de 200 nm siguiendo el protocolo del ejemplo 3. Se sometieron diez conejos blancos de Nueva Zelanda a la colocación de 20 endoprótesis vasculares (18 mm, metálicas sin recubrimiento, n = 10, y recubiertas con una capa de p-BuMA electroinjertado, n = 10) en las arterias iliofemorales, con anestesia general.

20 Un primer grupo de 5 animales se sacrificó a los 14 días y después un segundo grupo a los 28 días. Las arterias iliofemorales se extrajeron y se procesaron para realizar un corte transversal longitudinal, según el protocolo descrito por Finn et al., *Circulation*, 112, 270 (2005). Las secciones transversales se examinaron por SEM y la cobertura endotelial se estimó a partir de las imágenes de SEM (ibíd.).

Los resultados se resumen en las tablas 9 y 10 siguientes:

25 Tabla 9: cobertura endotelial (%) de secciones transversales longitudinales SEM, sobre puntales

	14 días	28 días
BMS	98%	93%
p-BUMA en BMS	88%	100%

Tabla 10: cobertura endotelial (%) de secciones transversales longitudinales SEM, entre puntales

	14 días	28 días
BMS	98%	93%
p-BUMA en BMS	89%	100%

30 Estos resultados muestran que, tanto sobre los puntales como entre los puntales, la cobertura endotelial (medida a partir del análisis SEM de las secciones transversales longitudinales) es superior o equivalente en las endoprótesis recubiertas con una capa de p-BuMA electroinjertado en comparación con endoprótesis metálicas sin recubrimiento. Se observará, en particular, que la recolonización es eficaz ya a los 14 días después de la implantación de las endoprótesis electroinjertadas, lo que demuestra que las endoprótesis óptimas basadas en esta tecnología deberían beneficiarse de este efecto y reducir el período de liberación del fármaco al mínimo para facilitar el efecto procurativo.

40 **Ejemplo 13: tolerancia local después de endoprótesis recubierta completamente en cerdos**

45 Se llevó a cabo un ensayo de 60 días en cerdos con una capa compuesta realizada a partir de una capa subyacente de p-BuMA electroinjertada (150 nm) recubierta con una capa de liberación biodegradable de PLGA (poli-láctida-co-glicolida) (5 µm). En resumen, dieciséis cerdos machos domésticos (25 a 30 kg) se sometieron a la colocación de 32 endoprótesis (18 mm de longitud, metálicas sin recubrimiento, n = 16 y endoprótesis recubiertas de doble capa, n = 16) en la arteria coronaria descendente anterior izquierdo (IVA) o circunfleja izquierda (Cx) con anestesia general.

50 Se selecciona un segmento con un diámetro coronario medio de 2.5 mm mediante el uso de una angiografía coronaria cuantitativa con una relación de endoprótesis con respecto a arteria de aproximadamente 1.2. Después se hace avanzar un catéter con globo montado con una endoprótesis a los segmentos coronarios preseleccionados para su despliegue sobre un cable guía estándar. El catéter con globo se infla a 10 atm durante 10 segundos una vez y después se retira lentamente, dejando la endoprótesis en su lugar (sin pre- o posdilatación).

IVUS coronario:

55 Para evaluar el grado de formación neointimal *in vivo*, el IVUS se realizó 8 semanas después de la implantación de la endoprótesis.

Muestras de arteria:

El corazón se extirpa 8 semanas después de la implantación de la endoprótesis. Las IVA, Cx y CD se retiran, se

enjuagan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y a continuación se preparan tal como se ha indicado para histomorfometría, análisis inmunoquímico o microscopía de barrido electrónico.

Histomorfometría

Las muestras se fijan en formalina (3%) a 4°C durante 12 h, se deshidratan en series graduadas de etanol (70° a 100° a 4°C) y acetona durante 24 h, después se embeben en metacrilato de glicometilo (GMA). Para cada muestra, se cortan secciones de 50 µm de espesor (Isomet, Buehler France) y se tiñen con Verhoeff-van Gieson para el análisis. Se observan secciones histológicas (Nikon E-600, Nikon, Francia), se realizan mediciones digitalizadas y de morfometría (Metamorph, Francia). El aumento de espesor neointimal se cuantifica mediante análisis morfométrico, realizado en 5 secciones para cada segmento de arteria. El área neointimal se mide como el área desde la lámina elástica interna (IEL) hasta el borde luminal, y el área media como el área entre la IEL y la lámina elástica externa. El aumento de espesor neointimal se expresa como la relación [(área neointimal/área neointimal + área del medio)].

Análisis inmunoquímico

Al final del proceso de desecación, se retiran las endoprótesis y las arterias se embeben en bloques de parafina que se cortan en secciones de 4 µm de espesor y a continuación se sumergen en una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma, Francia) para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. La tinción no específica se bloquea mediante una incubación de 10 minutos en PBS con albúmina bovina al 5%. Después de dos lavados en PBS, las secciones se incuban en diversos anticuerpos (antiMIB1, α-actina, factor VIII, macrófagos (AM-3K)). Dos observadores independientes cuentan las células teñidas en la neointima y las áreas del medio.

Microscopía electrónica de barrido

Para este propósito, las muestras se fijan con glutaraldehído al 4%, tampón fosfato 0.1 M, pH 7.2, durante 1 hora a 4°C y se lavan en PBS durante 1 hora. A continuación se deshidratan a través de un etanol graduado y acetona pura, y se secan en punto crítico a partir de CO₂ (CPD 010 BAL-TEC AG, Liechtenstein). Las muestras se recubren por pulverización con Au/Pd (Emscope Ashford UK) para la observación con microscopía electrónica de barrido (JSM 6300 Jeol Tokyo Japan) con electrones secundarios.

2.8. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizan por triplicado, y los resultados se expresan como la media ± SD. Se realiza un ensayo ANOVA en estos valores (p < Una preparación mediante tratamiento antiplaquetario (Plavix 300 mg y aspirina 75 mg) se inicia el día anterior a la cateterización y se continúa durante toda la duración del estudio (6 horas, 1 mes y 2 meses de seguimiento) a las cantidades habituales (Plavix 75 mg y aspirina 75 mg por día). Los cerdos se cateterizan por vía femoral en 6 french mediante radioscopia (Seldinger). Se dispone una sonda "EBU" (Medtronic) en el ostium del tronco coronario izquierdo y permite una opacificación selectiva de la red coronaria. Después de la inyección de 50 UI/kg de heparina, se lleva a cabo un control ecográfico endocoronario inicial (IVUS) (Atlantis Plus 40 mhz, Boston). El IVUS inicial posibilita estimar el diámetro de la arteria coronaria y guiar la implantación de la endoprótesis para obtener una relación endoprótesis/arteria del 120%. A continuación se coloca una endoprótesis en el segmento promedio del vaso (12 atm. 10 de sequedad). Después de un nuevo control coronariográfico e IVUS para asegurar la buena aposición de la endoprótesis, se retira la totalidad del material y se ejerce una compresión manual en el punto de la punción femoral hasta obtener la hemostasis. Después de dos meses de vida, se realiza una nueva cateterización tal como se ha descrito anteriormente para un control coronariográfico. La evaluación de la estenosis intraendoprótesis y la proliferación de la neointima se realiza mediante un nuevo IVUS.

El estudio pudo mostrar en primer lugar que la capa de liberación biodegradable había desaparecido después de las primeras 4 semanas, liberando así el 100% del fármaco. De hecho, por SEM solo se observa la capa de p-BuMA electroinjertado "rugosa" caracterizada por su aspecto "lunar" (irregularidades superficiales tipo "cráter" reproducibles; aunque es homogénea y tiene polímero en todas partes, incluso en los "orificios lunares"). Al observar por SEM la superficie de una endoprótesis explantada 30 días después de la implantación, se observan los "cráteres lunares" característicos del p-BuMA electroinjertado, que evidencian la desaparición completa de la capa biodegradable y, por lo tanto, la liberación total del fármaco. La desaparición de la capa biodegradable se confirma adicionalmente mediante el análisis por ToF-SIMS en la superficie dispuesta por encima y en la parte interna de la arteria, lo que revela la ausencia del fármaco del polímero biodegradable.

A partir de las observaciones de recolonización a las 8 semanas, el p-BuMA electroinjertado es propenso a la recolonización adecuada por parte de las células endoteliales.

Los resultados de IVUS demuestran una muy buena tolerancia de las endoprótesis recubiertas de doble capa, ya que después de 8 semanas de implantación se observó una cantidad muy baja de proliferación neointimal; esto se confirma mediante estudios inmunohistológicos que demuestran que el recubrimiento es muy seguro sin

inflamación, como se muestra mediante tinción con HES, una endotelización completa de tinción de von-Willebrand y una muy pequeña cantidad de proliferación de células musculares lisas.

Ejemplo 14: sistema de pulverización de "baja presión" para la fabricación de DES con una buena interfaz con capas electroinjertadas

La máquina está constituida por una caja para manipular con guantes con una pared transparente. Un sistema de barrido X-Y se dispone sobre la misma fuera de la caja, y mueve un imán en el exterior, que controla adicionalmente el movimiento X-Y de otro imán en el techo del interior de la caja. Este último imán interior está conectado además a una boquilla.

La pared más alejada de la caja presenta un apéndice macho que está conectado a un motor eléctrico exterior, que permite la rotación del apéndice a una velocidad controlable desde el panel frontal de la máquina mediante el ajuste del voltaje de dicho motor.

Las endoprótesis se disponen sobre agujas, que se insertan adicionalmente en las puntas del soporte de muestras. Todas estas puntas pueden girar con respecto al soporte de muestra: están conectadas a una varilla giratoria común dentro del soporte de muestras, que termina (en la parte posterior del soporte de muestras) en un apéndice femenino que puede conectarse al apéndice masculino en la pared más alejada de la caja. Por lo tanto, cuando todas las endoprótesis se colocan en las agujas que están conectadas a las puntas, y cuando el soporte de muestras se conecta a la pared más alejada de la caja, todas las endoprótesis giran simultáneamente y a la misma velocidad ajustable.

El sistema XY se maneja mediante un ordenador externo y controla la secuencia de movimientos y pulverizaciones de la boquilla, que se dispone encima de cada endoprótesis, una tras otra, y comienza a pulverizar mientras se mueve a lo largo de toda la longitud de la endoprótesis, un trayecto de ida y un trayecto de vuelta, antes de detener la pulverización para pasar a la endoprótesis siguiente y comenzar a pulverizar nuevamente. El soporte de muestras puede contener 20 endoprótesis por lote, de forma que la boquilla se desplaza desde la endoprótesis nº 20 hasta la endoprótesis nº 1 para una segunda secuencia de pulverización: cada endoprótesis básicamente "no ve" ningún rociado durante un período correspondiente a 19 veces el tiempo T_s para pulverizar una endoprótesis + una vez el tiempo T_0 necesario para el barrido de la boquilla en toda la longitud del soporte de muestras. Todas las endoprótesis observan exactamente el mismo protocolo, y la unidad de recubrimiento resulta ser muy reproducible.

Los resultados de la desviación de masa (masa del recubrimiento en una serie de 53 DES que se han pulverizado utilizando la máquina descrita anteriormente) muestran que con un criterio de aceptación del 15% con respecto a la masa objetivo (y, por lo tanto, a la dosis del fármaco objetivo), solo 3 DES son rechazadas por no cumplir las especificaciones, proporcionando un rendimiento total del 94.2%. Incluso si se aplica una tolerancia más estrecha del 10%, el sistema ofrece un rendimiento del 86.5%, que es sustancialmente más alto que con la mayor parte de los sistemas industriales existentes (para los cuales las especificaciones habituales están dentro de aproximadamente 20% de la dosis del fármaco).

Se atribuye esta calidad a la muy alta reproducibilidad del sistema en húmedo/de baja presión, que se promueve de forma ideal gracias a la humectación ofrecida por la capa electroinjertada apropiada. Asimismo se ha experimentado que, para una boquilla de baja presión, impulsada por gas, la correlación entre la concentración de fármaco en la solución de pulverización y la capa de polímero en el extremo es muy lineal y muy reproducible, aunque no sea una correlación estricta de uno a uno.

REIVINDICACIONES

1. Endoprótesis de elución de fármaco que comprende:
- 5 - un armazón de endoprótesis;
- un recubrimiento electroinjertado de poli(metacrilato de butilo) dispuesto sobre el armazón de endoprótesis, en la que el recubrimiento promueve la proliferación y la adhesión de las células endoteliales para asegurar la recolonización completa de la endoprótesis por células endoteliales;
- 10 - un recubrimiento de polímero biodegradable que aloja fármaco dispuesto sobre el recubrimiento electroinjertado.
2. Endoprótesis según la reivindicación 1, en la que la capa electroinjertada presenta un espesor entre 10 nanómetros y 1.0 micrómetro.
3. Endoprótesis de elución de fármaco según la reivindicación 1, en la que el polímero biodegradable es seleccionado de entre el grupo que consiste en poliglicólidos, polilactidas, policaprolactonas, y copolímeros de los mismos.
- 20 4. Endoprótesis de elución de fármaco según la reivindicación 1, en la que el recubrimiento de polímero biodegradable que aloja fármaco presenta un espesor entre 1 y 200 micras.
5. Endoprótesis de elución de fármaco según la reivindicación 1, que comprende además una capa de cubierta superior biodegradable.
- 25 6. Endoprótesis de elución de fármaco según la reivindicación 5, en la que la capa de cubierta superior está realizada a partir de la misma composición que la del recubrimiento a base de polímero biodegradable que aloja fármaco.
- 30 7. Endoprótesis según la reivindicación 1, en la que el armazón de endoprótesis comprende una base metálica.
8. Endoprótesis según la reivindicación 7, en la que la base metálica está realizada en por lo menos un material seleccionado de entre un grupo que consiste en acero inoxidable, nitinol, tantalio, aleaciones de cobalto-cromo como MP35N o MP20N, platino, titanio, una aleación biocompatible adecuada, un material biocompatible adecuado y una combinación de los mismos.
- 35 9. Endoprótesis de elución de fármaco según la reivindicación 1, en la que el recubrimiento de polímero aloja un agente bioactivo.
- 40 10. Endoprótesis de elución de fármaco según la reivindicación 9, en la que el agente bioactivo se selecciona de entre el grupo que consiste en un agente antisentido, un agente antineoplásico, un agente antiproliferativo, un agente antitrombogénico, un anticoagulante, un agente antiplaquetario, un antibiótico, un agente antiinflamatorio, un agente de terapia génica, una sustancia terapéutica, un fármaco orgánico, un compuesto farmacéutico, un producto de ADN recombinante, un producto de ARN recombinante, un colágeno, un derivado de colágeno, una proteína, un análogo de proteína, un sacárido y un derivado de sacárido.
- 45 11. Endoprótesis de elución de fármaco según la reivindicación 1, en la que los fármacos están encapsulados en un recubrimiento de fármaco-polímero que utiliza microperla, micropartícula o tecnología de nanoencapsulación con albúmina, liposoma, ferritina u otras proteínas y fosfolípidos biodegradables, antes de la aplicación sobre la endoprótesis recubierta con imprimador.
- 50

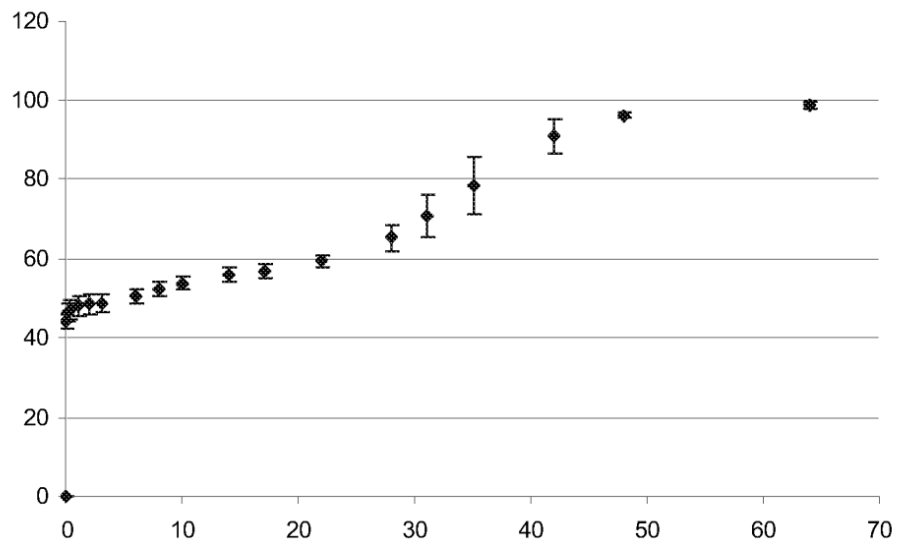


Fig. 1(A)

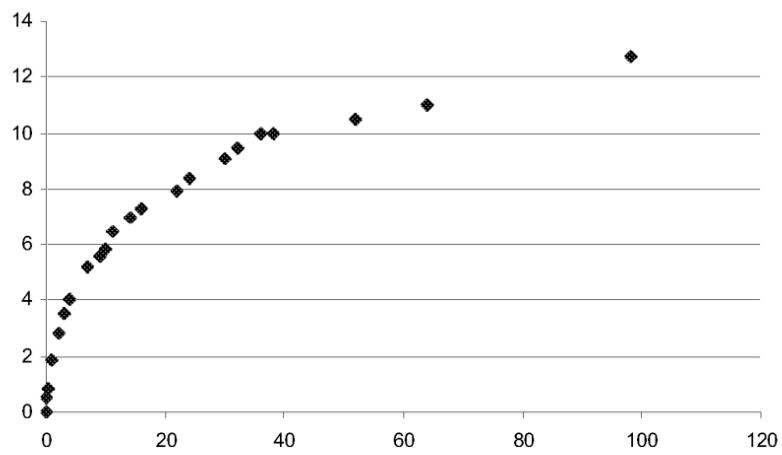


Fig. 1(B)

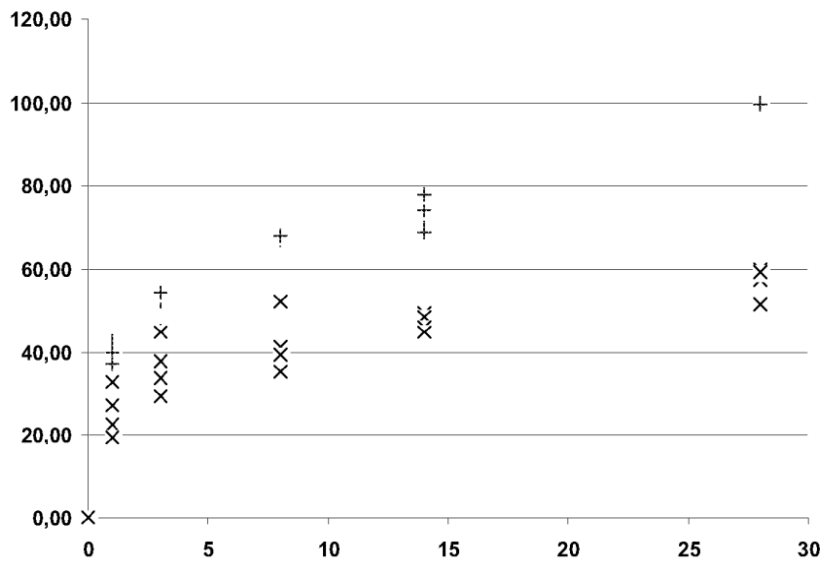


Fig. 2