

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 807 326

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

00 04554

⑤① Int Cl⁷ : A 61 L 27/34, A 61 L 33/08

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 10.04.00.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 12.10.01 Bulletin 01/41.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *THERAPEUTIQUES SUBSTITUTI-
VES Groupement d'intérêt public* — FR.

⑦② Inventeur(s) : MACHY DELPHINE, JOZEFONVICZ
JACQUELINE et LETOURNEUR DIDIER.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

⑤④ PROTHESE VASCULAIRE IMPREGNEE DE DEXTRANE RETICULE ET/OU D'UN DERIVE FONCTIONNALISE
DE DEXTANE RETICULE ET SON PROCEDE DE PREPARATION.

⑤⑦ L'invention se rapporte à une prothèse vasculaire sou-
ple qui comprend un support synthétique imprégné d'au
moins un dextrane réticulé de façon covalente et/ ou d'au
moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane réticulé de façon
covalente. L'invention se rapporte également à un procédé
de préparation de cette prothèse.

FR 2 807 326 - A1



La présente invention se rapporte à une prothèse vasculaire imprégnée de dextrane réticulé et/ou de dérivé fonctionnalisé de dextrane réticulé, ainsi qu'à un procédé de préparation d'une telle prothèse.

En chirurgie vasculaire réparatrice, l'utilisation de substituts
5 d'origine synthétique, tels que les prothèses en polyester, en nylon, en polypropylène, en polyacrylonitrile, en polyuréthane, en polyétheruréthane, en polyéthylène-téréphtalate ou en polytétrafluoroéthylène expansé, est une alternative à la greffe biologique.

Pour rendre ces substituts synthétiques biocompatibles et, dans le
10 cas où les substituts ne sont pas imperméables en eux-mêmes, pour leur conférer des propriétés d'imperméabilité, leur surface peut être revêtue de substances d'origine biologique, telles que des protéines plasmatiques (albumine ou fibrine) ou des protéines de la matrice extracellulaire (collagène, gélatine ou fibronectine).

Ces protéines présentent néanmoins l'inconvénient de provenir de
15 sources animales ou humaines, d'où un risque potentiel de contamination par des agents pathogènes et des toxines.

Il a également été proposé de revêtir la surface de ces substituts synthétiques par de l'alginate, carboxyméthylé ou non (Brevet US 5 415 619). Toutefois, on observe une coagulation rapide du sang à la surface de la prothèse et une
20 réponse inflammatoire importante après implantation de ce type de prothèse.

D'autre part, des prétraitements peuvent être effectués avec le sang du patient, avant implantation de la prothèse. Ces méthodes sont toutefois limitées car elles nécessitent des transfusions du patient, qui prennent du temps et ne peuvent pas être entreprises en cas d'urgence. En outre, elles ne peuvent pas être utilisées dans le
25 cas où les patients sont sous traitement anticoagulant, ce qui est souvent le cas.

La Demanderesse s'est donc donné pour but de pallier les inconvénients de l'art antérieur et de pourvoir à une prothèse vasculaire revêtue d'une substance qui ne soit pas d'origine animale, la prothèse résultante étant à la fois imperméable et souple. En outre, la prothèse munie de son revêtement doit être non
30 toxique et non thrombogène, et ne pas déclencher de réaction inflammatoire lorsqu'elle est implantée *in vivo*.

La présente invention a donc pour objet une prothèse vasculaire souple, caractérisée en ce qu'elle comprend un support synthétique imprégné d'au moins un dextrane réticulé de façon covalente et/ou d'au moins un dérivé
35 fonctionnalisé de dextrane réticulé de façon covalente.

Au sens de la présente invention, on entend par « souple » une

prothèse qui est aisément manipulable par le chirurgien lors de l'implantation, et qui est suffisamment flexible pour subir aisément des pliures et des torsions sans que la forme tubulaire de la prothèse ne s'affaisse et sans que les parois ne viennent s'accoler l'une à l'autre.

5 Le dextrane peut être défini comme un polysaccharide constitué d'un enchaînement d'unités α -D-glucopyranosiques reliées entre elles par des liaisons $\alpha(1-6)$.

Le support synthétique utilisé dans la prothèse selon la présente invention consiste par exemple en du polyester, du nylon, du polypropylène, du polyacrylonitrile, du polyuréthane, du polyétheruréthane, du polyéthylène-téréphtalate (tissé ou tricoté) ou du polytétrafluoroéthylène expansé.

La prothèse vasculaire souple selon l'invention présente l'avantage d'être imperméable eu égard à la présence du dextrane réticulé, et biocompatible (c'est-à-dire qu'elle ne déclenche pas une réponse biologique défavorable chez le sujet receveur) du fait de la présence du dérivé fonctionnalisé de dextrane réticulé. Elle est apte à la stérilisation par les rayonnements gamma et par l'oxyde d'éthylène, traitements qui n'altèrent ni son imperméabilité, ni sa souplesse.

L'utilisation du dextrane et/ou de dérivés fonctionnalisés du dextrane pour enduire le support prothétique écarte tout risque de contamination par des agents pathogènes de source animale. En outre, la prothèse conforme à la présente invention présente l'avantage de ne pas être thrombogène (elle n'active pas le système de la coagulation) et de ne déclencher aucune réaction inflammatoire chez le sujet receveur.

Des dérivés fonctionnalisés du dextrane utilisables pour imprégner la prothèse vasculaire selon la présente invention sont par exemple ceux qui sont décrits dans la Demande internationale PCT publiée sous le numéro WO 99/29734 ou dans l'article de D. LOGEART-AVRAMOGLU et J. JOZEFONVICZ paru dans *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 48, 578-590, 1999.

De tels dérivés, dont la préparation est décrite dans la Demande internationale PCT WO 99/29734, répondent par exemple à la formule générale $DMC_aB_bS_u_cS_d$ dans laquelle :

D représente une chaîne polysaccharidique, constituée par des enchaînements d'unités α -D-glucopyranosiques reliées entre elles par des liaisons $\alpha(1-6)$,

35 MC représente des groupes méthylcarboxylates,

B représente des groupes carboxyméthylbenzylamides,

Su représente des groupes sulfates,

S représente des groupes sulfonates, et

\underline{a} , \underline{b} , \underline{c} et \underline{d} représentent le degré de substitution (ds), exprimé par rapport au nombre de fonctions hydroxyles libres dans une unité glucosidique du dextrane, respectivement en groupements MC, B, Su et S, \underline{a} étant égal à 0 ou \geq à 0,2, \underline{b} étant égal à 0 ou \geq à 0,1, \underline{c} étant égal à 0 ou \geq à 0,1 et \underline{d} étant égal à 0 ou \leq à 0,15, à condition que lorsque $\underline{d} = 0$, \underline{a} et/ou \underline{b} sont $\neq 0$.

Parmi ces dérivés fonctionnalisés du dextrane, on peut plus particulièrement utiliser ceux qui sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

10 . les dextrans fonctionnalisés dans lesquels $\underline{a} \geq 0,5$, \underline{c} est égal à 0 ou $\leq 0,5$ et $\underline{d} \leq 0,15$ ou égal à 0 et dont la masse molaire moyenne en poids est comprise entre 3 000 et 5 000 000 g/mol,

. les dextrans fonctionnalisés dans lesquels $\underline{a} \geq 0,3$, \underline{c} est égal à 0 ou $\leq 0,4$ et $\underline{d} \leq 0,15$ ou égal à 0 et dont la masse molaire moyenne en poids est comprise
15 entre 3 000 et 5 000 000 g/mol,

. les dextrans fonctionnalisés dans lesquels $\underline{a} \geq 0,5$, \underline{c} est égal à 0 ou $\leq 0,4$ et $\underline{d} \leq 0,15$ ou égal à 0 et dont la masse molaire moyenne en poids est comprise entre 3 000 et 5 000 000 g/mol, et

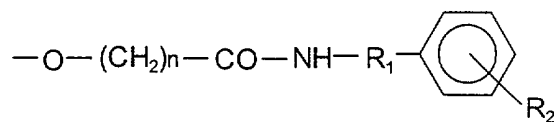
20 . les dextrans fonctionnalisés dans lesquels $\underline{a} \geq 0,2$, $\underline{c} \geq 0,3$ et $\underline{d} \leq 0,15$ ou égal à 0 et dont la masse molaire moyenne en poids est comprise entre 3 000 et 5 000 000 g/mol.

A titre d'exemples supplémentaires de dérivés fonctionnalisés du dextrane utilisables pour imprégner la prothèse vasculaire selon la présente invention, on peut également citer :

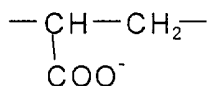
25 1) les dérivés de dextrane décrits dans le Brevet européen 0 146 455, qui comportent de manière statistique :

. au moins 35% environ de motifs B constitués de motifs osides A substitués par des radicaux possédant une fonction carboxyle répondant à la structure $-O-(CH_2)_n-R-COO^-$ dans laquelle R représente une simple liaison ou un groupe
30 $-CO-NH-(CH_2)_{n'}$, n étant un nombre compris entre 1 et 10 et n' étant compris entre 1 et 7,

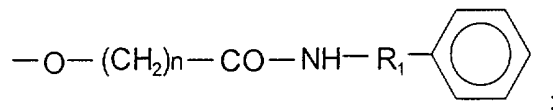
. au moins 3% environ de motifs D, c'est-à-dire de motifs osides A substitués par une chaîne comportant un groupe de structure :



dans laquelle n est tel que défini ci-dessus, R₂ représente un anion d'un sel minéral ou organique physiologiquement tolérable, et R₁ représente une simple liaison, un groupe -CH₂- ou un groupe :



5 . éventuellement, des motifs osides A non substitués et/ou des motifs C constitués de motifs A substitués par des radicaux de structure suivante, dans laquelle R₁ et n sont tels que définis ci-dessus :



10 2) les dérivés de dextrane décrits dans le Brevet européen 0 428 182, qui comprennent des motifs A et C et au moins 35% de motifs B, ces motifs étant tels que définis ci-dessus en rapport avec le Brevet européen 0 146 455.

Selon un mode de réalisation avantageux des prothèses vasculaires conformes à la présente invention, le rapport pondéral entre le dérivé fonctionnalisé de dextrane et le dextrane est compris entre 1/99 et 30/70, de préférence compris entre
15 3/97 et 7/93, de manière encore préférée égal à 5/95 environ

Selon un autre mode de réalisation avantageux des prothèses vasculaires conformes à la présente invention, ledit support synthétique est imprégné, en outre, d'au moins un polysaccharide naturel ou synthétique fonctionnalisé au moins par des fonctions carboxylates et/ou sulfates, réticulé de façon covalente. Un tel
20 polysaccharide fonctionnalisé est par exemple l'héparine.

Le rapport pondéral entre le polysaccharide fonctionnalisé et le dextrane est avantageusement compris entre 1/99 et 30/70, de préférence entre 1/99 et 20/80.

Lorsque la prothèse vasculaire conforme à la présente invention
25 comprend à la fois un dérivé fonctionnalisé de dextrane et un polysaccharide fonctionnalisé, le rapport pondéral entre le dérivé fonctionnalisé de dextrane et le polysaccharide fonctionnalisé est avantageusement compris entre 1/99 et 99/1.

Lorsque des dérivés fonctionnalisés de dextrane et/ou des polysaccharides naturels ou synthétiques fonctionnalisés par au moins des fonctions
30 carboxylates et/ou sulfates, tels que définis ci-dessus, sont présents dans la prothèse conforme à l'invention, ils confèrent à cette dernière des activités biologiques spécifiques.

En particulier, la présence de dérivés fonctionnalisés de dextrane

interactions spécifiques avec le milieu biologique dans lequel elle est implantée ; on observe notamment une prolifération des cellules endothéliales humaines à l'intérieur de la prothèse, processus qui favorise l'intégration de la greffe dans le milieu biologique.

5 En outre, en fonction de leurs degrés de substitution en différents groupements fonctionnalisés, les dérivés fonctionnalisés de dextrane et les polysaccharides fonctionnalisés décrits ci-dessus peuvent présenter des propriétés cicatrisantes, des activités anti-complémentaires et de substitut du plasma sanguin, une activité modulatrice de la prolifération cellulaire ou encore des propriétés
10 anticoagulantes.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'une prothèse vasculaire telle que décrite ci-avant, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) préparation d'une solution d'au moins un dextrane et/ou d'au
15 moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane,
b) imprégnation du support synthétique à l'aide de cette solution,
c) réticulation dudit dextrane et/ou dudit dérivé fonctionnalisé de dextrane.

La solution préparée lors de l'étape a) peut consister en une solution
20 aqueuse, classiquement à base d'eau osmosée. Elle comprend par exemple entre 1 et 70% (m/V) de dextrane, ou entre 1 et 70% (m/V) de dérivé fonctionnalisé de dextrane, ou entre 1 et 70% (m/V) de dextrane et de dérivé fonctionnalisé de dextrane, en fonction du type de dextrane utilisé et de sa masse molaire moyenne en poids.

Le dextrane utilisé dans le procédé selon l'invention présente de
25 préférence une masse molaire moyenne en poids comprise entre 10 000 et 50 000 000 g/mol.

On peut citer, à titre d'exemples, les dextranses T40, T70 et T500, de masses molaires moyennes en poids respectivement égales à environ 40 000, 70 000 et 460 000 g/mol, commercialisés par la société Pharmacia Biotech, et le dextrane 5M de
30 masse molaire moyenne en poids égale ou supérieure à $5 \cdot 10^6$ g/mol, commercialisé par la société Sigma. En fonction du type de dextrane utilisé, la solution préparée lors de l'étape a) du procédé selon la présente invention comprend par exemple de 20 à 70% (m/V) de dextrane T40, de 10 à 70% (m/V) de dextrane T70, de 10 à 50% (m/V) de dextrane T500, ou de 1 à 15% (m/V) de dextrane 5M.

35 Selon un mode de mise en œuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, ce dernier comprend, entre les étapes a) et b), l'ajout à la

solution préparée lors de l'étape a) d'un agent de réticulation, par exemple le STMP (trimétaphosphate de sodium), l'oxychlorure de phosphore (POCl_3), l'épichlorhydrine, les formaldéhydes, les carbodiimides, les glutaraldéhydes ou tout autre composé qui convient pour réticuler un polysaccharide.

5 Dans ce mode de mise en œuvre, les étapes b) et c) sont avantageusement effectuées simultanément à un pH compris entre 3 et 10, à une température comprise entre 10 et 40°C environ et pendant un temps inférieur ou égal à 150 minutes environ.

10 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, ce dernier comprend, entre les étapes b) et c), une étape de séchage du support, suivie d'une étape d'imprégnation du support à l'aide d'une solution, dans au moins un solvant organique (tel que l'éther), d'un agent de réticulation.

15 Un agent de réticulation convenable est par exemple un carbodiimide ou le BDGE (butanediol-1,4 diglycidyl éther), ce dernier pouvant être utilisé à raison de 10 à 30% en moles pour 100 moles de motifs glucosidiques du polysaccharide (dextrane fonctionnalisé ou non), ou tout autre agent de réticulation soluble dans un solvant organique.

20 Dans ce mode de mise en œuvre, les étapes b) et c) sont avantageusement effectuées chacune à un pH compris entre 3 et 10 et à une température comprise entre 10 et 40°C environ, l'étape b) étant avantageusement effectuée pendant un temps inférieur ou égal à 150 minutes environ et l'étape c) pendant un temps compris entre 15 minutes et 18 heures environ.

25 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdites étapes successives de préparation d'une solution d'au moins un dextrane et/ou d'au moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane, d'imprégnation du support à l'aide de cette solution, de séchage du support, d'imprégnation du support à l'aide d'une solution, dans au moins un solvant organique, d'un agent de réticulation, et de réticulation dudit dextrane et/ou dudit dérivé fonctionnalisé de dextrane sont, après séchage
30 du support, répétées au moins une fois, de préférence deux à trois fois.

35 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, l'étape c) de réticulation du dextrane et/ou du dérivé fonctionnalisé de dextrane est suivie d'une étape de lavage de la prothèse, par exemple au moyen d'un mélange d'eau osmosée et d'agents assouplissants et/ou plastifiants tels qu'ils seront décrits ci-après.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé

conforme à la présente invention, ladite solution d'au moins un dextrane et/ou d'au moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane préparée lors de l'étape a) comprend, en outre, au moins un polysaccharide naturel ou synthétique fonctionnalisé au moins par des fonctions carboxylates et/ou sulfates.

5 De tels polysaccharides sont tels que décrits précédemment en rapport avec la prothèse vasculaire souple conforme à la présente invention.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé conforme à la présente invention, ladite solution d'au moins un dextrane et/ou d'au moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane préparée lors de l'étape a) comprend,
10 en outre, au moins un additif choisi parmi les agents plastifiants et les agents assouplissants et/ou un ou plusieurs principes actifs sélectionnés dans le groupe constitué par les agents anticoagulants (tels que l'antivitamine K ou l'aspirine), les agents anti-bactériens et les agents anti-infectieux. Lesdits principes actifs peuvent par exemple être présents dans ladite solution aqueuse à raison de 1 à 10% en poids par
15 rapport aux polysaccharides utilisés.

A titre d'exemples d'agents plastifiants utilisables, on peut citer le glycérol ou le mannitol, présents par exemple à raison de 1 à 10% en volume.

A titre d'exemples d'agents assouplissants utilisables, on peut citer l'acide lactique, l'acide ascorbique, l'éthylène glycol, le propylène glycol ou le
20 sorbitol, présents par exemple à raison de 0,1 à 5% en volume.

Des exemples d'agents anti-bactériens et d'agents anti-infectieux utilisables sont, de façon non limitative, la rifampicine, la minocycline, la chlorhexidine, des ions argent et des compositions à base d'argent.

La présente invention a, en outre, pour objet une prothèse vasculaire
25 souple telle que définie précédemment, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention tel que défini ci-dessus.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation de prothèses vasculaires selon la présente invention et
30 d'évaluation de leur biocompatibilité cellulaire, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente schématiquement la structure d'un dérivé fonctionnalisé de dextrane substitué par les différents groupements chimiques MC, B, Su et S fixés sur les unités glucosidiques D ; à titre d'exemple, la position du
35 substituant sur les différents carbones des unités glucosidiques est présentée sur le carbone 2 ; et

- la figure 2 représente les courbes de croissance des cellules endothéliales humaines permanentes EA.hy 926 sur des échantillons de prothèses vasculaires selon l'invention comprenant soit un dérivé non fonctionnalisé de dextrane (courbe -■-), soit un dérivé non fonctionnalisé de dextrane et un dérivé fonctionnalisé de dextrane (courbe -▲-), le temps (en jours) figurant en abscisses et le nombre de cellules par cm^2 ($\times 10$) en ordonnées.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

10 **EXEMPLE 1 : Préparation de prothèses vasculaires selon la présente invention, qui comprennent un support synthétique imprégné d'un dextrane réticulé à l'aide de BDGE.**

1) Support synthétique, dextrane et agent de réticulation utilisés.

Le support synthétique utilisé consiste en du polyéthylène-téréphtalate (PET) tricoté, fourni par la société Cardial & Bard sous la dénomination commerciale « Dialine I ». Sa perméabilité à l'eau est de 1010 ml/min/cm^2 selon la norme ISO/DIS 7198:1996. Il se présente sous la forme d'un textile cosselé de 40 à 60 cm de longueur (sous forme étirée) et de 8 à 10 mm de diamètre. Des échantillons de 20 cm de longueur (étirée) sont utilisés dans le cadre du présent exemple.

Le dextrane utilisé est du dextrane 5M de masse molaire moyenne en poids égale à $5 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$, commercialisé par la société Sigma.

Quant à l'agent de réticulation du dextrane, il s'agit du BDGE (butanediol-1,4 diglycidyl éther, ALDRICH).

2) Protocole.

Le protocole de préparation des prothèses vasculaires consiste en des séries de cycles successifs d'imprégnation du support synthétique de PET par une solution de dextrane et de réticulation dans un solvant organique, séparées par des étapes de séchage.

Les solutions de dextrane préparée en vue des étapes d'imprégnation sont des solutions à 9, 9,5 et 10% (m/V) de dextrane 5M dans de l'eau osmosée. A ces solutions sont ajoutés de l'acide lactique (0,7% en volume) et du glycérol (2% en volume). Le pH est ajusté à 7 à l'aide d'une solution de soude 2M.

L'imprégnation du support synthétique en PET est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique qui aspire la solution de dextrane et l'entraîne à l'intérieur de l'échantillon tubulaire, par ses deux extrémités. Le temps d'imprégnation est d'environ 10 secondes à 5 minutes.

L'imprégnation est suivie du séchage des échantillons dans une étuve à 40°C pendant 24 heures.

On effectue ensuite une étape de réticulation du dextrane : les échantillons sont placés dans une solution d'éther, à laquelle on ajoute le BDGE (22,3 moles pour 100 moles de motifs glucosidiques du dextrane). La réticulation est effectuée pendant 18 heures.

Les échantillons sont ensuite séchés pendant une heure sous une hotte aspirante.

On effectue trois cycles successifs d'imprégnation et de réticulation, puis les échantillons sont lavés trois fois trois heures à l'aide d'une solution d'eau osmosée comprenant 0,7% (V/V) d'acide lactique et 2% de glycérol (V/V), de pH 7.

3) Résultats.

Pour chaque échantillon, on mesure le taux de revêtement de l'échantillon R (%), qui correspond à l'augmentation de la masse de l'échantillon après son traitement par la solution polysaccharidique ($R = (P_2 - P_1) / P_1 \times 100$, P_1 représentant la masse initiale de l'échantillon et P_2 sa masse finale après traitement).

On mesure en outre la perméabilité statique des échantillons selon la norme ISO/DIS 7198:1996, qui consiste à mesurer le débit d'eau passant à travers une surface donnée d'une prothèse échantillonnée, par gravimétrie et sous pression hydrostatique. L'échantillon peut être immergé dans de l'eau pure à température ambiante afin de l'imprégner d'eau avant de procéder à l'essai (« perméabilité Hyd » : perméabilité à l'état hydraté), ou être soumis directement à l'essai (« perméabilité non Hyd » : perméabilité à l'état non hydraté). La perméabilité est le quotient du débit d'eau (en ml/min) par unité d'aire (en cm²) : elle est exprimée en ml/min/cm². Dans les exemples qui suivent, sauf mention contraire, les perméabilités mesurées sont des perméabilités statiques obtenues selon la norme ISO/DIS 7198:1996.

Les résultats obtenus pour les prothèses 1 à 3 sont rassemblés dans le tableau I.

30

Tableau I

Prothèse n°	Concentration de la solution d'imprégnation en dextrane (m/V)	R (%)	Perméabilité Non Hyd	Perméabilité Hyd
1	9%	24 ± 2	54	1,5
2	9,5%	22 ± 3	50	1
3	10%	27 ± 1	14	1

Les prothèses 1 à 3 présentent le caractère de souplesse requis et des taux de revêtement permettant d'obtenir une bonne étanchéité tout en conservant la souplesse de l'échantillon.

EXEMPLE 2 : Autre exemple de préparation de prothèses vasculaires selon la présente invention, qui comprennent un support synthétique imprégné d'un dextrane réticulé à l'aide de BDGE.

Le support synthétique, le dextrane et l'agent de réticulation utilisés sont tels que décrits dans l'exemple 1. A la différence de l'exemple 1, le protocole suivi ne comprend que deux cycles successifs d'imprégnation et de réticulation, avec trois lavages de trois heures en fin de protocole. Les solutions d'imprégnation sont constituées de dextrane 5M à la concentration de 10% (m/V), sans glycérol ni acide lactique lors du premier cycle et avec 2% en volume de glycérol pour le deuxième cycle. La concentration en BDGE, identique pour les deux cycles, est de 15, 18 ou 20% (en nombre de moles par rapport à 100 moles de motifs glucosidiques du dextrane) selon les échantillons.

Les résultats obtenus pour les prothèses 4 à 6, qui présentent le caractère de souplesse requis, sont rassemblés dans le tableau II.

Tableau II

Prothèse n°	Quantité de BDGE (% molaire)	R (%)	Perméabilité Non Hyd	Perméabilité Hyd
4	20%	27 ± 1	2	1
5	18%	26 ± 0,5	14	5
6	15%	25,5 ± 1	20	6

20

EXEMPLE 3 : Préparation de prothèses vasculaires selon la présente invention, qui comprennent un support synthétique imprégné d'un dextrane réticulé à l'aide de STMP, ainsi qu'éventuellement un polysaccharide fonctionnalisé.

1) Support synthétique, dextrans et agent de réticulation utilisés.

25

Le support synthétique (PET tricoté) et le dextrane (dextrane 5M) utilisés sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 1. L'agent de réticulation consiste en du STMP (trimétaphosphate de sodium, commercialisé par SIGMA).

30

Le dérivé fonctionnalisé de dextrane utilisé, de masse molaire moyenne en poids est d'environ 106 900 g/mol, est le DMC_3B_2 ; il répond à la formule générale $DMC_aB_bSu_cS_d$ telle que précédemment décrite, dans laquelle le degré de substitution en groupements méthylcarboxylates (indice a) est égal à 0,87 et

le degré de substitution en groupements carboxyméthylbenzylamides (indice b) est égal à 0,26, les indices c et d étant égaux à 0. Son protocole de préparation est tel que décrit dans le Brevet européen publié sous le numéro 0 146 455.

2) Protocole.

5 Une solution de dextrane 5M à 10% (m/V) est préparée dans de la soude 0,2 M en présence de 0,7% (en volume) d'acide lactique et de 2% (en volume) de glycérol. Cette solution peut également comprendre, si nécessaire, le dérivé fonctionnalisé de dextrane DMC_3B_2 ; auquel cas, le dextrane 5M est mélangé, en phase solide, au dextrane DMC_3B_2 avant d'être mis en solution, la proportion de DMC_3B_2
10 étant égale à 3% en poids par rapport au poids du dextrane 5M, soit un rapport pondéral de 3/97 entre le dérivé fonctionnalisé de dextrane et le dextrane 5M.

En variante, la solution de dextrane peut également comprendre de l'héparine (agent anticoagulant) à raison de 1%, de 3%, de 5% ou de 10% en poids par rapport au poids du dextrane 5M, soit des rapports pondéraux entre l'héparine et le
15 dextrane respectivement égaux à 1/99, 3/97, 5/95 et 10/90.

La solution d'imprégnation ainsi préparée est chauffée à 40°C pendant 20 minutes, puis le STMP (8 moles pour 100 moles de motifs glucosidiques du dextrane 5M et du dextrane DMC_3B_2 , si ce dernier est présent), préalablement dilué dans 0,5 ml de soude 0,2 M, est ajouté à la solution d'imprégnation.

20 Le support synthétique est imprégné par cette solution de la même façon que décrit dans l'exemple 1, à température ambiante et pendant 10 secondes à 5 minutes. Si le dextrane DMC_3B_2 est présent, ce dernier sera « co-réticulé » avec le dextrane 5M.

La prothèse est séchée pendant 2 heures à 40°C, puis lavée trois fois,
25 pendant 3 heures, à l'aide d'une solution d'eau osmosée comprenant 0,7% (V/V) d'acide lactique et 2% de glycérol (V/V), de pH 7.

3) Résultats.

Les résultats obtenus pour les prothèses 7 à 12 sont rassemblés dans le tableau III, les paramètres de quantité de revêtement R et de perméabilités étant
30 mesurés comme indiqué dans l'exemple 1.

Tableau III

Prothèse n°	Composition du revêtement	Perméabilité Non Hyd	Perméabilité Hyd
7	dextrane 5M	0	0
8	dextrane 5M + DMC ₃ B ₂	0	0
9	Dextrane 5M + héparine (1%)	3,3	0
10	dextrane 5M + héparine (3%)	10	0
11	Dextrane 5M + héparine (5%)	30	0
12	Dextrane 5M + héparine (10%)	40	0

Les prothèses 7 à 12 sont souples. La présence du dérivé fonctionnalisé de dextrane DMC₃B₂ ou de l'héparine ne perturbe pas la réaction de réticulation, les perméabilités à l'état hydraté étant identiques dans les échantillons 7 à 12.

EXEMPLE 4 : Autre exemple de préparation de prothèses vasculaires selon la présente invention, qui comprennent un support synthétique imprégné d'un dextrane réticulé à l'aide de STMP.

Le support synthétique (PET tricoté) et l'agent de réticulation (STMP) sont identiques à ceux utilisés dans l'exemple 3. Le dextrane utilisé est le T500, de masse molaire moyenne en poids égale à 460 000 g/mol, commercialisé par la société Pharmacia Biotech.

On procède de la même façon que dans l'exemple 3, la solution d'imprégnation comprenant 22% (m/V) de dextrane T500, 0,7% (en volume) d'acide lactique et 2% (en volume) de glycérol. Le STMP est présent à raison de 8% (en moles pour 100 moles de motifs glucosidiques du dextrane).

On obtient l'échantillon de prothèse 13, qui présente les propriétés de souplesse et d'imperméabilité requises et dont les caractéristiques sont rassemblées dans le tableau IV.

Tableau IV

Prothèse n°	Composition du revêtement	R (%)	Perméabilité Non Hyd	Perméabilité Hyd
13	dextrane T500	27 ± 1	1,5	0,5

EXEMPLE 5 : Autres exemples de préparation de prothèses vasculaires selon la présente invention, qui comprennent un support synthétique imprégné d'un dextrane réticulé à l'aide de STMP.

Le support synthétique (PET tricoté), l'agent de réticulation (STMP) et les dextrans (T500 ou 5M) utilisés sont identiques à ceux décrits dans les exemples 3 et 4.

On procède de la même façon que dans l'exemple 3, la solution d'imprégnation comprenant soit 20% (m/V) de dextrane T500, soit 10% (m/V) de dextrane 5M, ainsi que 0,7% (en volume) d'acide lactique et 2% (en volume) de glycérol. Le STMP est présent à raison de 8% (en moles pour 100 moles de motifs glucosidiques du dextrane).

On fait varier le temps de contact, à savoir l'intervalle de temps séparant l'ajout du STMP à la solution de dextrane et l'imprégnation de l'échantillon à l'aide de cette solution.

On obtient les échantillons de prothèses 14 à 19, qui présentent les propriétés de souplesse et d'imperméabilité requises, et dont les caractéristiques sont rassemblées dans le tableau V.

Tableau V

Prothèse n°	Composition du revêtement	Temps de contact (minutes)	R (%)	Perméabilité Non Hyd	Perméabilité Hyd
14	dextrane T500	2	31 ± 1,0	1	0
15	dextrane T500	15	33 ± 1,5	0	0
16	dextrane T500	30	43 ± 1,0	0	0
17	dextrane 5M	15	24 ± 1,5	0,2	0
18	dextrane 5M	30	25 ± 0,5	0	0
19	dextrane 5M	45	25 ± 0,2	0	0

Des prothèses vasculaires souples et imperméables selon la présente invention peuvent donc être obtenues en variant le temps de contact de l'agent de

réticulation avec la solution de dextrane, avant imprégnation du support synthétique.

La réaction de réticulation du dextrane débute dès que l'agent de réticulation est mis en contact avec la solution de dextrane, provoquant une augmentation de la viscosité de la solution d'imprégnation. L'imprégnation du support prothétique doit être réalisée à un stade auquel la solution d'imprégnation n'est ni trop liquide (ce qui donnerait un revêtement trop fin), ni trop visqueuse (l'imprégnation du support prothétique étant alors difficile). Les temps de contact exemplifiés dans le tableau V ci-dessus conviennent pour l'obtention de prothèses aux caractéristiques souhaitées.

10 **EXEMPLE 6 : Stérilisation d'une prothèse selon la présente invention par rayonnements gamma.**

Des échantillons de la prothèse 7 préparée dans l'exemple 3 ont été stérilisés par rayonnements gamma, à une dose de 25 kGray. Les perméabilités des prothèses stérilisées ont été mesurées, ainsi que celles de prothèses identiques non stérilisées. Les résultats sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI

Type de revêtement	R (%)	Perméabilité	
		Non Hyd	Hyd
Prothèse non stérile	25	0	0
Prothèse stérile	25	0	0

Les prothèses restent étanches et souples après stérilisation aux rayons gamma. Les rayonnements gamma ne semblent pas dégrader l'aspect des revêtements des prothèses. Au contraire, ils ont probablement un effet analogue à celui d'un agent réticulant : ils créent des radicaux libres capables d'interagir entre eux et qui peuvent former des liaisons covalentes.

25 **EXEMPLE 7 : Mesure de la perméabilité intégrale à l'eau des prothèses vasculaires selon la présente invention.**

1) Nature des échantillons de prothèses.

On utilise la prothèse 7 préparée dans l'exemple 3, qui comprend 10% (m/V) de dextrane 5M, ainsi qu'une prothèse 20, préparée conformément à l'exemple 3 en utilisant 10% (m/V) de dextrane 5M et 7% (exprimé en poids par rapport à la quantité de dextrane 5M) de DMC₃B₂, soit un rapport pondéral entre le dérivé fonctionnalisé de dextrane et le dextrane 5M égal à 7/93. L'agent de réticulation est le STMP, présent dans la solution d'imprégnation à raison de 8% en

moles pour 100 moles de motifs glucosidiques du dextrane.

2) Paramètres mesurés.

Pour les prothèses 7 et 20, on mesure :

5 . la perméabilité statique à l'état hydraté ou non hydraté (mesurée selon la norme ISO/DIS 7198:1996 telle que présentée dans l'exemple 1),

. la perméabilité intégrale à l'eau, évaluée selon la procédure normalisée ISO 7198. Dans le tableau VI ci-dessous figurent la longueur de l'échantillon (l, en cm), le volume d'eau récupéré (V, en ml/min) et la perméabilité intégrale (P, en ml/min/cm²),

10 . le taux de revêtement R, mesuré comme indiqué dans l'exemple 1,
 . le pourcentage d'humidité relative HR, ce paramètre ayant une influence sur la souplesse de l'échantillon. On effectue une pesée de l'échantillon à l'état sec (après passage dans une étuve à 40°C) et à l'état humidifié (échantillon placé dans une cloche à 80% d'humidité), la différence entre ces pesées, rapportée au poids
 15 de l'échantillon sec, permettant d'obtenir le pourcentage d'humidité relative HR.

3) Résultats.

Les caractéristiques des échantillons 7 et 20, qui présentent notamment les propriétés de souplesse et de perméabilité requises, sont rassemblées dans le tableau VII.

20

Tableau VII

Prothèse n°	Perméabilité Non Hyd	Perméabilité Hyd	Perméabilité intégrale			R (%)	HR (%)
			l	V	P		
7	0	0	8,4	2,1	0,08	36	52
20	0,67	0	7,3	12	0,52	31	45

EXEMPLE 8 : Biocompatibilité cellulaire *in vitro* des prothèses vasculaires selon la présente invention.

25

1) Protocole.

Pour analyser la cytocompatibilité des prothèses 7 et 8 synthétisées dans l'exemple 3 avec les cellules endothéliales humaines EA.hy 926, des échantillons de 1 cm² sont découpés sur les prothèses, stérilisés par rayonnements gamma et introduits dans des plaques de culture de 24 puits. Des inserts de verre stériles sont
 30 placés sur les échantillons afin de les empêcher de s'enrouler sur eux-mêmes une fois immergés dans le milieu de culture.

Les échantillons de prothèses sont maintenus pendant 24 heures dans

le milieu de culture, à savoir un milieu DMEM sans pyruvate de sodium comprenant 4500 mg/ml de glucose (GIBCO), supplémenté en L-glutamine (2 mM), en HAT (2% V/V) et en sérum de veau fœtal à 10% (GIBCO), puis le milieu est aspiré et les échantillons sont ensemencés avec les cellules endothéliales humaines EA.hy 926 à la densité de $5 \cdot 10^4$ cellules/cm², chaque échantillon étant réalisé en triple exemplaire. Les échantillons ensemencés sont placés dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂, dans des conditions statiques. Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

La prolifération cellulaire est observée chaque jour pendant 8 jours, au moyen d'un microscope optique inverse. A cette fin, les échantillons sont lavés trois fois dans du PBS (non stérile), fixés dans du formaldéhyde à 4%, lavés de nouveau trois fois dans du PBS, puis colorés au bleu de Coomassie (5%) et enfin décolorés à l'éthanol à 70%, de façon à ce que seules les membranes des cellules restent colorées. Au microscope, les cellules apparaissent en bleu sur fond non coloré.

2) Résultats.

La figure 2 représente les courbes de croissance des cellules endothéliales humaines permanentes EA.hy 926 sur les échantillons de prothèses vasculaires 7 (courbe -■-) et 8 (courbe -▲-), le temps (en jours) figurant en abscisses et le nombre de cellules par cm² (x 10) en ordonnées.

On constate une différence significative entre la croissance des cellules sur les échantillons 7 et 8 : lorsque le DMC₃B₂ est présent dans le revêtement de la prothèse, le nombre de cellules est plus important au fur et à mesure des jours écoulés, indiquant que la présence du dérivé fonctionnalisé de dextrane dans la prothèse améliore la prolifération des cellules endothéliales humaines EA.hy 926.

Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres cultures de cellules endothéliales, à savoir les cellules endothéliales de veine de cordons ombilicaux humains et les cellules endothéliales d'aorte bovine. Il apparaît donc que, de manière générale, la présence d'un dérivé fonctionnalisé de dextrane dans la prothèse vasculaire selon la présente invention favorise la prolifération des cellules endothéliales, propriété d'importance pour favoriser l'intégration de la greffe dans le milieu biologique.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Prothèse vasculaire souple, caractérisée en ce qu'elle comprend un support synthétique imprégné d'au moins un dextrane réticulé de façon covalente et/ou d'au moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane réticulé de façon covalente.

2°) Prothèse selon la revendication 1, caractérisée en ce que le rapport pondéral entre le dérivé fonctionnalisé de dextrane et le dextrane est compris entre 1/99 et 30/70, de préférence compris entre 3/97 et 7/93, de manière encore préférée égal à 5/95 environ.

3°) Prothèse selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ledit support synthétique est imprégné, en outre, d'au moins un polysaccharide naturel ou synthétique fonctionnalisé au moins par des fonctions carboxylates et/ou sulfates, réticulé de façon covalente.

4°) Prothèse selon la revendication 3, caractérisée en ce que le rapport pondéral entre le polysaccharide fonctionnalisé et le dextrane est avantageusement compris entre 1/99 et 30/70, de préférence entre 1/99 et 20/80.

5°) Prothèse selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisée en ce que le rapport pondéral entre le dérivé fonctionnalisé de dextrane et le polysaccharide fonctionnalisé est compris entre 1/99 et 99/1.

6°) Procédé de préparation d'une prothèse vasculaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) préparation d'une solution d'au moins un dextrane et/ou d'au moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane ,

b) imprégnation du support synthétique à l'aide de cette solution,

c) réticulation dudit dextrane et/ou dudit dérivé fonctionnalisé de dextrane.

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend, entre les étapes a) et b), l'ajout d'un agent de réticulation à la solution préparée lors de l'étape a).

8°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les étapes b) et c) sont effectuées simultanément à un pH compris entre 3 et 10, à une température comprise entre 10 et 40°C environ et pendant un temps inférieur ou égal à 150 minutes environ.

9°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend, entre les étapes b) et c), une étape de séchage du support, suivie d'une

étape d'imprégnation du support à l'aide d'une solution, dans au moins un solvant organique, d'un agent de réticulation.

10°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les étapes b) et c) sont effectuées chacune à un pH compris entre 3 et 10 et à une température comprise entre 10 et 40°C environ, en ce que l'étape b) est effectuée pendant un temps inférieur ou égal à 150 minutes environ et en ce que l'étape c) est effectuée pendant un temps compris entre 15 minutes et 18 heures environ.

11°) Procédé selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que lesdites étapes successives de préparation d'une solution d'au moins un dextrane et/ou d'au moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane, d'imprégnation du support à l'aide de cette solution, de séchage du support, d'imprégnation du support à l'aide d'une solution, dans au moins un solvant organique, d'un agent de réticulation, et de réticulation dudit dextrane et/ou dudit dérivé fonctionnalisé de dextrane sont, après séchage du support, réitérées au moins une fois, de préférence deux à trois fois.

12°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, caractérisé en ce que l'étape c) de réticulation dextrane et/ou dudit dérivé fonctionnalisé de dextrane est suivie d'une étape de lavage de la prothèse.

13°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 12, caractérisé en ce que ladite solution d'au moins un dextrane et/ou d'au moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane préparée lors de l'étape a) comprend, en outre, au moins un polysaccharide naturel ou synthétique fonctionnalisé au moins par des fonctions carboxylates et/ou sulfates.

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 à 13, caractérisé en ce que ladite solution d'au moins un dextrane et/ou d'au moins un dérivé fonctionnalisé de dextrane préparée lors de l'étape a) comprend, en outre, au moins un additif choisi parmi les agents plastifiants et les agents assouplissants et/ou un ou plusieurs principes actifs sélectionnés dans le groupe constitué par les agents anticoagulants, les agents anti-bactériens et les agents anti-infectieux .

15°) Prothèse vasculaire souple selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 6 à 14.

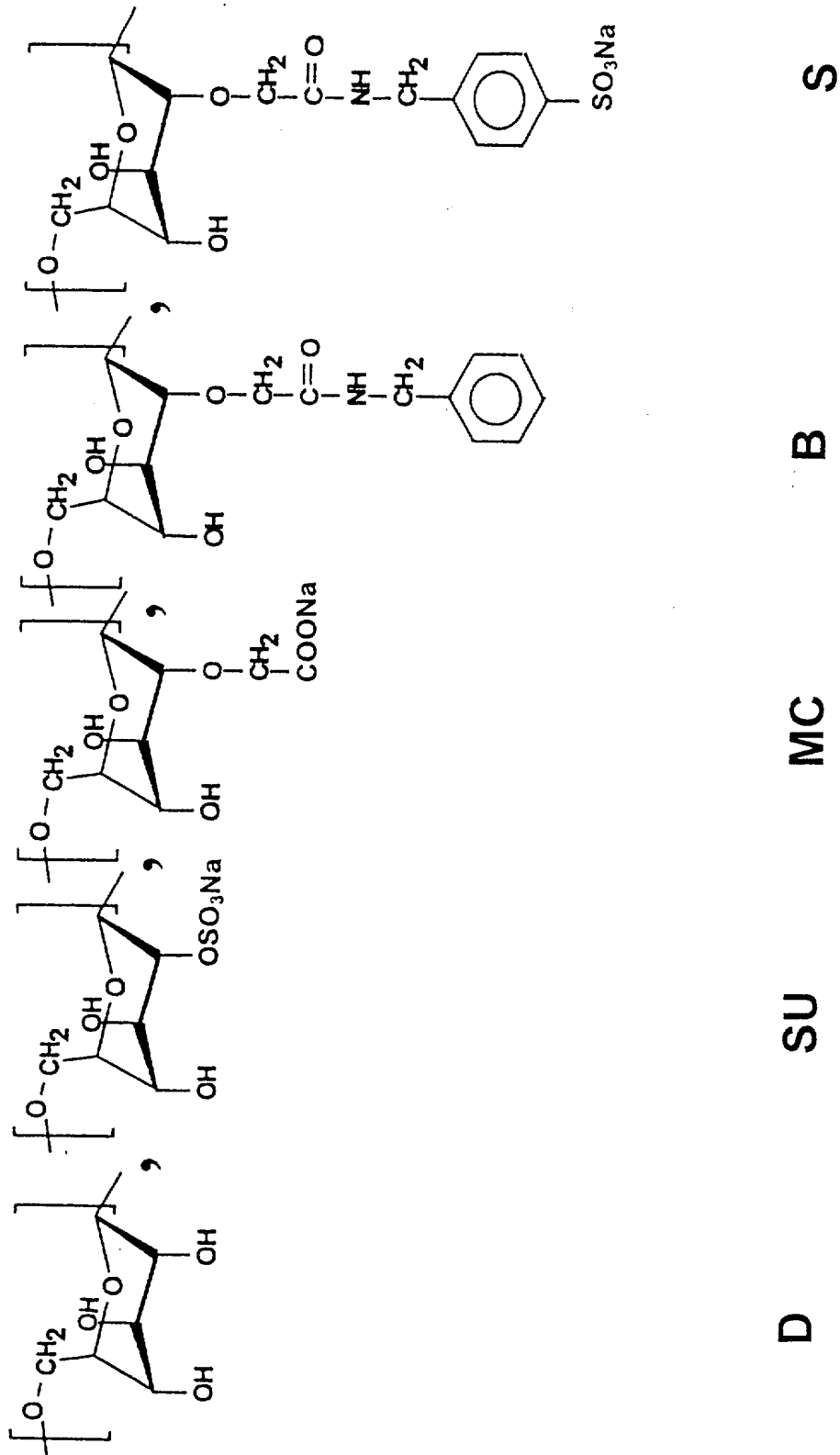


FIGURE 1

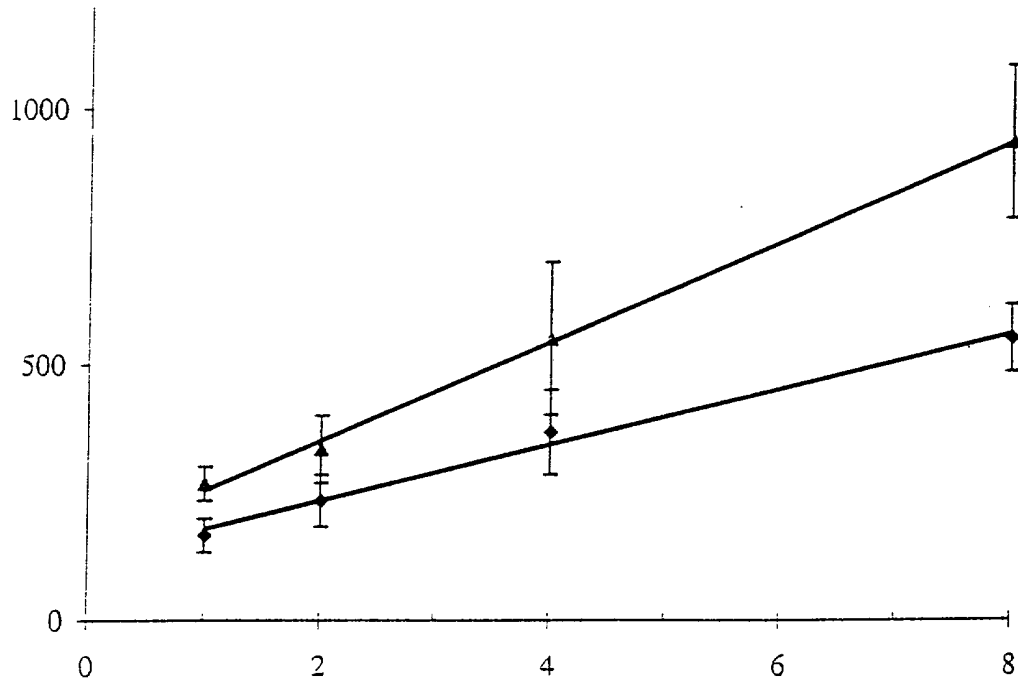


FIGURE 2

