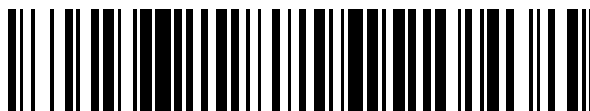


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 220**

51 Int. Cl.:

A61L 27/30 (2006.01)

A61N 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2015 PCT/EP2015/070754**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16038158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2015 E 15762613 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3191147**

54 Título: **Dispositivo implantable con adhesión celular selectiva y método de producción**

30 Prioridad:
10.09.2014 LU 92539

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2019

73 Titular/es:
**LUXEMBOURG INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (LIST) (50.0%)
5, avenue des Hauts-Fourneaux
4362 Esch-sur-Alzette, LU y
LUXEMBOURG INSTITUTE OF HEALTH (50.0%)**

72 Inventor/es:
**LENOBLE, DAMIEN;
THOMANN, JEAN-SÉBASTIEN y
PALISSOT, VALÉRIE**

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 708 220 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

Dispositivo implantable con adhesión celular selectiva y método de producción

Campo técnico

5 [0001] La presente invención se refiere al campo de los materiales y dispositivos implantables. En particular se refiere a un dispositivo implantable que tiene un sustrato sobre el que se mejora el crecimiento y la adhesión celular.

Antecedentes de la invención

10 [0002] Se han investigado y propuesto varios materiales y dispositivos para examinar y/o restaurar actividades de diferentes células y tejidos biológicos. El objetivo de tal investigación es proporcionar un material o un dispositivo capaz de reconectar, por ejemplo, neuronas humanas con células postsinápticas de modo que las funciones neuronales perdidas se puedan reparar o mejorar mediante dispositivos implantados. Como ejemplo, el primer implante neuroprotésico-coclear exitoso puesto en práctica a principios de la década de 1990 es un dispositivo de interfaz neural que utiliza una matriz de electrodos para estimular el nervio auditivo en la cóclea con impulsos eléctricos. La estimulación eléctrica de los nervios periféricos ha ganado mucho interés de los clínicos para el tratamiento del dolor, para la restauración de las funciones de motricidad y para el tratamiento de la epilepsia. Adicionalmente, la comunidad de investigación en neuroingeniería ha investigado varios dispositivos de interfaz neural para el sistema nervioso central (SNC). Tales dispositivos se diseñan para regular trastornos del estado de ánimo, la epilepsia o síntomas que surgen con la enfermedad de Parkinson, a través de suministros apropiados de carga eléctrica con estimulación cerebral profunda. El registro de señales cerebrales se ha usado para controlar una interfaz cerebro-ordenador, BCI [1]. Los autoinjertos de nervios [2] son el estándar clínico actual para la regeneración de nervios periféricos a través de grandes espacios de los nervios, es decir, espacios que tienen una longitud mayor de 20 mm. Actualmente no se conocen canales sintéticos para guiar nervios por la falta de materiales adecuados que permitan la transmisión de señales y el crecimiento guiado de las células.

[0003] Los dispositivos implantables y las interfaces neurales se enfrentan en particular a varios desafíos:

- 25 - reducir la respuesta inflamatoria y la gliosis alrededor de los implantes, ya que estos reducen la relación señal a ruido suministrada hacia/desde los dispositivos o llevan a fallos de registro crónico [3];
 - mejorar la resolución espacial de las interfaces neurales que permiten la recopilación y el suministro de señales hacia o desde una parte del cerebro densa en neuronas;
 30 - estimular selectivamente áreas precisas para inducir respuestas específicas desde el sistema nervioso central (SNC).

[0004] En lo que sigue y en toda la descripción de la presente solicitud, el término biocompatibilidad se usará para referirse a la capacidad de un dispositivo implantado y sus materiales componentes para ejecutar su función deseada en su entorno implantado, manteniendo las respuestas celulares y tisulares beneficiosas, y sin provocar efectos locales o sistémicos indeseables en el cuerpo.

35 [0005] Además, la biocorrosión de un dispositivo o material implantado se refiere al crecimiento descontrolado de tejido en el dispositivo o el material.

40 [0006] Aunque se han probado varios materiales para aplicaciones de bioimplantes *in vivo*, los polímeros son hoy en día los materiales de elección debido a su plasticidad y biocompatibilidad. En las interfaces cerebro-mecánicas, BMI, los polímeros se usan sobre todo como matrices de encapsulación para materiales semiconductores. Varios polímeros, tales como poli(3,4-etilendioxitiofeno), PEDOT, polianilina o politiofeno, se conocen por tener propiedades conductoras. El uso de polímeros conductores puede aumentar la biocompatibilidad de un material implantado y permitir la interacción con las células circundantes. Sin embargo, los polímeros conductores siguen siendo muy sensibles a los cambios en la impedancia causados por biocorrosión o la absorción de los materiales en las células inmunitarias residentes del cerebro [4].

45 [0007] Aunque la plasticidad que se encuentra en los polímeros es importante, se requiere, sin embargo, un mínimo de rigidez para diseñar sustratos con la capacidad para guiar y para examinar células, tales como neuronas.

50 [0008] En aplicaciones relacionadas con interfaces máquina-cerebro, hay una necesidad de interfaces en las que las conexiones sinápticas de las neuronas se puedan desarrollar en sustratos artificiales. El crecimiento debería ser controlado y dirigido con precisión a ubicaciones definidas. Se ha investigado el uso de etapas de

procesamiento de nanotecnología convencional para crear canales, pocillos o pilares [5] en la superficie de los chips semiconductores, lo que llevó a controlar el crecimiento celular siguiendo un patrón diseñado. Tales técnicas son especialmente adecuadas para redes a medida de células neuronales, con reticulaciones sobre sitios transductores en la superficie de chips electrónicos. Los chips estándares basados en Si se han investigado ampliamente para este fin, pero la falta de estabilidad química limita su uso *in vivo*. Por lo tanto, el uso de dispositivos basados en Si requiere tecnología de empaquetamiento específica para evitar la rápida oxidación del silicio bajo condiciones básicas o ácidas. Se conocen varias enzimas que reaccionan con el silicio o su óxido. De hecho, la hidrólisis de SiO₂ lleva generalmente a la liberación de ácido silícico, Si(OH)₄, la toxicidad del cual es aún desconocida a bajas concentraciones. A altas concentraciones, se sospecha que el Si(OH)₄ interactúa con compuestos que contienen aluminio y contribuye a la degeneración neuronal. Se ha demostrado que los biosensores basados en Si inducen inflamación cuando se usan en implantes cerebrales. Volviendo a los materiales semiconductores, el carburo de silicio, SiC, se conoce por tener una excelente estabilidad química y propiedades interesantes de biocompatibilidad [6]. En función de su fase cristalina, la banda prohibida del SiC varía de 2,3 a 3,2 eV. Sin embargo, sus propiedades electrónicas son difíciles de ajustar debido a la baja tolerancia a los defectos de red. Las áreas transversales más pequeñas de las sondas de Si han mostrado una respuesta astrogliar más lenta que electrodos más grandes. Sin embargo, la respuesta inflamatoria gliótica fue similar para todos los diseños después de varias semanas [7]. Debido a su destacable estabilidad química, el nitruro de galio, GaN, se ha identificado como un buen candidato para el desarrollo de dispositivos implantables o de biorregistro [8]. El GaN puede funcionalizarse para permitir el acoplamiento de péptidos. Se pueden usar péptidos específicos para promover la bioadhesión o reducir el riesgo de inflamación tisular [9]. Algunos compuestos terciarios III-V abren el camino para diseñar nuevos materiales semiconductores con propiedades optoelectrónicas ajustables. Desafortunadamente, pocos de ellos se describen en la técnica como biocompatibles. El AlGaIn se describió como biocompatible en [10], sin embargo, la proporción de Al/Ga era pequeña, limitando así las ventanas de aplicación para este material.

Kim et al. ("Formation of V-shaped pits in InGaN/GaN multiquantum wells and bulk InGaN films", Applied Physics Letters, volumen 73, número 12, 1998, 1634-1636) describen la formación de capas de InGaIn sin discutir sus propiedades de bioadhesión.

El documento de patente WO 2009/0654171 A1 revela una matriz de electrodos para un implante coclear y el uso de la silicona como material biocompatible. El documento de patente US 2011/0282421 A1 revela dispositivos para el crecimiento neuronal en los que una capa de partículas de nanodiamante se usa como una superficie de crecimiento neuronal.

Problema técnico a resolver

[0009] Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo implantable que mejore o promueva selectivamente la adhesión celular al mismo mientras que permite controlar el crecimiento celular, y que supere al menos algunas de las desventajas del estado de la técnica.

Resumen de la invención

[0010] Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia o para diagnóstico.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo implantable. El dispositivo comprende un sustrato que tiene una superficie. Una primera parte de la superficie se usa para entrar en contacto directo con células o tejidos biológicos. La parte de superficie comprende In_(x)Ga_(1-x)N, donde x está en el intervalo de 0,001 a 0,999. La primera parte de la superficie promueve la adhesión celular al sustrato y dirige el crecimiento celular en el sustrato y, además, define un componente semiconductor del dispositivo.

[0011] El sustrato puede tener varias superficies que comprenden una parte del primer tipo. Preferiblemente, x puede estar en el intervalo de 0,001 a 0,88 o 0,01 a 0,88. Preferiblemente, la primera parte puede cubrir íntegramente la superficie del sustrato. La primera parte puede ser contigua o no contigua en dicha superficie.

La superficie del sustrato puede además comprender preferiblemente una segunda parte que es diferente de dicha primera parte, donde dicha segunda parte inhibe la adhesión celular al sustrato, y donde dicha segunda parte comprende nitruro de indio, InN.

Preferiblemente, la primera y la segunda parte pueden cubrir íntegramente dicha superficie de dicho sustrato. El sustrato puede comprender preferiblemente nitruro de indio, InN.

La primera y/o la segunda parte pueden preferiblemente proporcionarse como una capa fina en la superficie del sustrato.

Además, la primera y/o la segunda parte pueden preferiblemente proporcionarse como una capa gruesa en la superficie del sustrato.

Aún más preferiblemente, la primera parte puede definir un patrón en la superficie del sustrato, a lo largo del cual se mejora la adhesión celular. El patrón puede comprender líneas rectas. El patrón puede comprender, por lo

general, áreas planas o formas circulares. Alternativamente, el patrón puede ser un patrón tridimensional que comprende, por ejemplo, pilares o cualquier estructura repetida.

[0012] El patrón puede, preferiblemente, estar delimitado por una serie de pilares que comprenden InN, dispuestos a lo largo de al menos una línea.

5 [0013] El dispositivo puede comprender, preferiblemente, al menos un electrodo para estimular y/o monitorizar las células/los tejidos en contacto.

[0014] Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para promover selectivamente la adhesión y el crecimiento de las células en una parte de la superficie de un sustrato de un dispositivo implantable. La parte se usa para ponerse en contacto directo con células o tejidos biológicos. El método comprende la etapa de desarrollar una capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ en dicha parte, donde x está en el intervalo de 0,001 a 0,999.

10

[0015] Preferiblemente, el método puede comprender las etapas de formar una primera capa de InN en un sustrato y formar después selectivamente una segunda capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ encima de dicha primera capa, donde x está en el intervalo de 0,001 a 0,999.

[0016] El método puede comprender además las etapas de formación de una primera capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, donde x está en el intervalo de 0,001 a 0,999, en un sustrato, la formación posterior de una segunda capa de InN encima de dicha primera capa y la eliminación selectiva posterior de partes de dicha segunda capa, para exponer la primera capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$.

15

[0017] La segunda capa puede cubrir preferiblemente dicha primera capa.

[0018] Preferiblemente, dicha segunda capa de InN se elimina selectivamente mediante grabado.

20 [0019] Alternativamente, dicha segunda capa de InN se elimina selectivamente por fresado por haces iónicos.

[0020] Se ha demostrado que el nitruro de indio, InN, es un material biocompatible no tóxico que inhibe el crecimiento celular en su superficie. Mediante la adición de cantidades pequeñas de galio, Ga, dentro del cristal para obtener $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, los inventores han demostrado que el material resultante se puede usar como un sustrato biocompatible y adherente para las células. El $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ rico en indio permite el diseño de sustratos implantables sensibles a la luz, que serán especialmente adecuados para registrar y/o enviar información directamente desde/hacia las células en contacto con el implante y también pueden promover el crecimiento controlado de las células mediante estímulos eléctricos u ópticos. $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ es un material semiconductor con banda prohibida ajustable. Por lo tanto, utilizando la invención, puede proporcionarse una pluralidad de transistores de efecto de campo en un sustrato, donde su sensibilidad puede ser ajustada mediante la cantidad de Ga que se añade al InN.

25

30

[0021] Mediante estampado de un sustrato de InN para comprender un patrón en la superficie de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, el crecimiento celular se puede dirigir de manera precisa a lo largo de patrones bien definidos de dos o tres dimensiones. Específicamente, la invención permite el crecimiento de neuronas y la monitorización de neuronas a lo largo de patrones predefinidos, o el crecimiento a medida de redes neuronales a lo largo de trayectorias predeterminadas en el sustrato.

35

[0022] Utilizando un sustrato conforme a la invención, se pueden diseñar herramientas para estudiar la formación y la plasticidad de circuitos neurales pequeños *in vitro*. Además, como un ejemplo de aplicaciones *in vivo*, el sustrato se puede usar en interfaces cerebro-máquina, para las que se pueden controlar y dirigir con precisión a ubicaciones definidas las conexiones sinápticas de las neuronas cultivadas en sustratos artificiales conforme a la invención.

40

Breve descripción de los dibujos

[0023] Varias formas de realización de la presente invención se ilustran mediante figuras, que no limitan el alcance de la invención, donde:

45 - las figuras 1a a 1d ilustran esquemáticamente la estructura de las muestras que tienen una capa superior de GaN, InN o $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, respectivamente;

- las figuras 2a y 2b ilustran los resultados de viabilidad celular obtenidos usando las muestras de la figura 1 para las líneas celulares MCF10A y HS-5, respectivamente;
- las figuras 3a, 3b y 3c ilustran los resultados de adhesión celular obtenidos usando las muestras de la figura 1, donde la adhesión de diferentes líneas celulares sobre las muestras de GaN, InN e $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ se muestran en las figuras 3a, 3b y 3c, respectivamente;
- la figura 4 ilustra la morfología de las células HEK cultivadas en diferentes sustratos;
- la figura 5 ilustra esquemáticamente un sustrato de un dispositivo implantable según una forma de realización preferida de la invención;
- la figura 6 ilustra esquemáticamente un sustrato de un dispositivo implantable según una forma de realización preferida de la invención;
- las figuras 7a y 7b ilustran esquemáticamente métodos de funcionalización adicional de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$;
- la figura 8a ilustra esquemáticamente una vista superior de un sustrato de un dispositivo implantable según una forma de realización preferida de la invención;
- las figuras 8b y 8c ilustran esquemáticamente vistas laterales de un sustrato de un dispositivo implantable según una forma de realización preferida de la invención;
- la figura 9 muestra el crecimiento dirigido de una neurona humana en un dispositivo implantable que tiene un sustrato según una forma de realización preferida de la invención.

Descripción detallada de la invención

[0024] Esta sección describe la invención con más detalle en base a formas de realización preferidas y a las figuras. Primero, se describen los materiales y métodos para obtener los resultados presentados. Debe entenderse que las características técnicas presentadas para una forma de realización específica se pueden combinar con características de otras formas de realización, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Materiales y métodos

[0025] Para simular el comportamiento celular en presencia de un dispositivo que comprende una capa superior, es decir, una capa de contacto con células, que comprende materiales $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, se sintetizaron diferentes estructuras utilizando deposición química en fase de vapor en un sustrato de zafiro o de silicio. Las estructuras se muestran en las figuras 1a a 1d, donde la figura 1a muestra una capa de contacto con células hecha de GaN. La figura 1b, muestra una capa de contacto con células hecha de InN. La figura 1c muestra una capa de contacto con células hecha de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, donde hay presente un 12,5% de Ga. Finalmente, la figura 1d muestra una capa de contacto con células hecha de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, donde hay presente un 25% de Ga. Las capas intermedias ilustradas se eligieron para optimizar el transporte de señales eléctricas desde y hacia las respectivas capas superiores. Su presencia no afecta a los resultados en cuanto a la bioadhesión y la toxicidad de las capas superiores. La adhesión y el crecimiento celular en el nitruro de galio se conocen del estado de la técnica. Para evaluar la toxicidad y la bioadhesión de las células en presencia de la respectiva capa superior, se han realizado ensayos Sigma XTTTM y estudios de bioadhesión.

[0026] La disposición experimental usada para obtener los resultados proporcionados se describe en lo que sigue.

[0027] Para realizar la microscopía de adhesión, se colocaron elementos en placas de 24 pocillos con un elemento de 25 mm² por pocillo. Se añadieron 500 µl de GFP (proteína verde fluorescente)-suspensión de PC12 que contenía 5000 y 10000 células, respectivamente, en medio Eagle modificado de Dulbecco, DMEM-suero de caballo al 1% con 100 ng/ml de factor de crecimiento nervioso, y se incubó durante 72 horas.

[0028] Antes de tomar imágenes en un microscopio Westburg EvosTM, los sobrenadantes se aspiraron y se sustituyeron por medio DMEM fresco sin rojo de fenol. La toma de imágenes de los elementos se realizó mediante experimentos de microscopía confocal usando un microscopio Zeiss LSM 510TM en medio DMEM fresco sin rojo de fenol, o mediante microscopía óptica en modo reflectivo usando un microscopio ZeissTM en solución salina tamponada con fosfato, PBS.

[0029] Se usó AdriblastinaTM de Pfizer como solución inyectable lista para usar de doxorrubicina, Dox. El factor de crecimiento nervioso de InvitrogenTM NGF2.5S se diluyó en PBS/albúmina de suero bovino al 0,1% y se almacenó a -20°C.

[0030] Se usaron tres líneas celulares en los ensayos. Primero, la línea celular epitelial no tumorigénica mamaria humana MCF10A se cultivó en medio DMEM/F12 suplementado con suero de caballo al 5%, factor de crecimiento epidérmico EGF (Sigma-AldrichTM, 20 ng/ml), hidrocortisona (Sigma-AldrichTM, 0,5 mg/ml), toxina del cólera (GentaurTM, 100 ng/ml), insulina (Sigma-AldrichTM, 10 mg/ml), 100 U/ml de penicilina y estreptomina.

[0031] En segundo lugar, la línea celular estromal HS-5 se cultivó en DMEM, suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina y estreptomina.

5 [0032] En tercer lugar, la línea celular PC-12 derivada a partir de un tumor neuroendocrino trasplantable de la médula suprarrenal de rata se cultivó en suero de caballo al 10%, suero bovino fetal al 5%, 100 U/ml de penicilina y estreptomina. El fenotipo neuronal en este modelo se induce usando 100 ng/ml de factor de crecimiento nervioso en DMEM-suero de caballo al 1% durante 72 horas. Las células PC12 dejan de dividirse y se diferencian terminalmente cuando se tratan con factor de crecimiento nervioso. Esto hace que las células PC12 sean útiles como un sistema modelo para la diferenciación neuronal.

10 [0033] Todas las líneas celulares se mantuvieron a una temperatura de 37°C en un entorno ambiental que contenía un 5% de CO₂ y un 95% de humedad.

15 [0034] La viabilidad celular se determinó usando un ensayo colorimétrico Sigma-Aldrich XTT™ conforme a las instrucciones del fabricante. Se sembraron 3000 células por pocillo en una placa de 48 pocillos con o sin los diferentes elementos durante 46 a 96 horas. Cuatro horas antes del final de la exposición, se añadió XTT. Al final de la exposición, se leyeron las densidades ópticas de los sobrenadantes a 490 nm. Un control positivo de la toxicidad se obtuvo con tratamiento de doxorrubicina.

20 [0035] Las figuras 2a y 2b ilustran la viabilidad de las células epiteliales mamarias MCF10 (figura 2a) y las células estromales HS5 (figura 2b) en la respectiva capa de contacto con células de zafiro, GaN, In_(x)Ga_(1-x)N (con un 12,5% de Ga y un 25% de Ga, respectivamente) e InN. Las células se incubaron durante 48, 72 o 96 horas en presencia de las diferentes muestras, incluyendo un control y una muestra de dox. Esto último es un control positivo que induce la muerte celular. Los resultados se expresan en porcentaje (densidad óptica, OD, calculada para una muestra dada/OD calculada para la muestra de control). Como se puede observar, la viabilidad celular de HS5 o de MCF10 no se ve afectada en presencia de In_(x)Ga_(1-x)N. De manera interesante, lo mismo es cierto para el InN y el zafiro. El control positivo de Dox demuestra que las células evaluadas no son más resistentes de lo normal.

25 [0036] Las figuras 3a, 3b y 3c ilustran los resultados de bioadhesión celular obtenidos como se ha descrito en las diferentes capas de GaN, InN e In_(x)Ga_(1-x)N. Además de las células HS5 y MCF10, las células PC12 se evaluaron como modelo para las células neuronales. En el caso del InN, sustancialmente, ninguna célula es capaz de adherirse en el sustrato. En la placa de Petri, las células han crecido en la parte de plástico como en la muestra de control, sin signos de toxicidad inducida. Esto confirma los resultados de viabilidad mostrados en las figuras 2a y 2b. Se ha observado que, en In_(x)Ga_(1-x)N, el crecimiento celular es similar al GaN, lo que es sorprendente debido a la débil proporción de Ga en la aleación de InN. Para las células HS5, se ha observado que el crecimiento celular es claramente dependiente de la proporción de Ga presente en la aleación de InN. Por lo tanto, es posible controlar el crecimiento celular variando la proporción de Ga en In_(x)Ga_(1-x)N, es decir, variando la proporción de x. La forma celular se controló usando células de riñón embrionario humano, HEK, en microscopía confocal. La figura 4 muestra la morfología de las células HEK en diferentes muestras. Las células HEK se transfectoron con el gen de la proteína verde fluorescente, GFP, que produce una proteína fluorescente. La forma celular no difiere de la obtenida en vidrio para los materiales de GaN y de In_(x)Ga_(1-x)N, lo que indica un desarrollo celular normal en ambos sustratos.

30 [0037] Las células neuronales no son capaces de producir colágeno y, en general, pueden no adherirse a un sustrato de vidrio/zafiro sin recubrimiento previo. Nuestros resultados demuestran las propiedades sobresalientes de InGaN que permiten promover no solo la adhesión, sino también una red neuronal sin recubrimiento previo.

Métodos de funcionalización de In_(x)Ga_(1-x)N:

45 [0038] Se describen varios métodos para funcionalizar GaN en la bibliografía. El experto puede aplicar métodos similares para superficies de In_(x)Ga_(1-x)N. Esto permite que la superficie de In_(x)Ga_(1-x)N sea biofuncionalizada/bioconjugada con biomoléculas o funciones químicas para aplicaciones específicas, tales como mejorar la selectividad celular o promover la diferenciación celular. Una de estas guías de red se basa en el injerto fotoquímico (254 nm) de "alqueno funcionalizado". Esta reacción requiere tratar GaN con plasma de H para obtener la unión de Ga-H. Alternativamente, el GaN se puede oxidar con una solución piraña y recubrirse luego con "silanos funcionalizados" (como APTES). Sin embargo, estas dos técnicas pueden inducir una modificación importante de la banda prohibida. Se ha propuesto un método que permite obtener grupos amino libres en la superficie de GaN, así como mantener las propiedades electrónicas. El método usa un plasma de descarga luminiscente de radiofrecuencia con aire humidificado para generar residuos amino. Estas técnicas diferentes se

pueden usar para generar grupos amino libres en las superficies de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ /GaN (figura 7a). Los grupos amino pueden reaccionar con enlazadores hetero bifuncionales que contienen fracciones reactivas con tiol (como la maleimida). De esta manera, se pueden conjugar fácilmente biomoléculas que contienen la función tiol o derivadas de ácidos carboxílicos, respectivamente, en la capa de maleimido-GaN (figura 7b) o en la capa de amino.

Aplicaciones:

[0039] En una forma de realización preferida de la invención como se ilustra en la figura 5, el sustrato 100 de un dispositivo implantable comprende una superficie 102 que tiene una primera parte 110, que comprende $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, estando x en el intervalo de 0,001 a 0,999. La presencia del $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ y la proporción de x mejora o promueve selectivamente la adhesión celular al sustrato 100.

[0040] Aunque el sustrato 100 se representa como plano, puede proporcionarse en cualquier forma geométrica. La aplicación en la que se usa el sustrato define generalmente las restricciones en su forma, que el experto en la técnica será capaz de adaptar apropiadamente sin una carga excesiva.

[0041] La parte 110 puede cubrir la superficie entera 102 o todas las superficies del sustrato. Alternativamente, el sustrato mismo puede proporcionarse como material $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ en masa, y pueden proporcionarse regiones con diferentes proporciones de x sobre el mismo para ajustar selectivamente los índices de adhesión celular y de crecimiento celular sobre el mismo.

[0042] Según otra forma de realización de la invención ilustrada en la figura 6, la superficie 202 del sustrato 200 comprende además una segunda parte 220 que es distinta de dicha primera parte 210. La segunda parte 220 inhibe la adhesión celular al sustrato 200 y comprende nitruro de indio, InN. Como ambos materiales son no tóxicos, el sustrato se puede usar para aplicaciones *in vitro*, así como *in vivo*. Por ejemplo, el sustrato es utilizable para producir un dispositivo implantable que mejora localmente el crecimiento de las células, incluidas células neuronales.

[0043] Métodos para la formación de capas finas (que varían desde un grosor de una fracción de un nanómetro hasta varios micrómetros) o gruesas, así como, patrones de InN y/o $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ en un sustrato de soporte se conocen como tales en la técnica y no se describirán con detalle alguno en el contexto de esta invención. Específicamente, se puede formar un patrón de trayectorias o superficies que mejoren la adhesión celular selectivamente en un sustrato que, de otro modo, inhibe la adhesión celular. Con este fin, un sustrato hecho de InN se puede dopar localmente con Ga a lo largo de los trayectorias o superficies que forman el patrón.

[0044] Un sustrato ilustrativo 300 se muestra en una vista superior en la figura 8a. Una primera parte de la superficie que promueve la adhesión celular 310 comprende $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, mientras que una segunda parte de la superficie que inhibe la adhesión celular 320 comprende InN. Tal patrón de superficie puede obtenerse utilizando diferentes técnicas. La figura 8b es una vista lateral que muestra un primer ejemplo según el cual puede obtenerse la estructura mostrada en la figura 8a. Una primera capa de InN 320 puede proporcionarse o formarse en un sustrato 300. El sustrato puede, por ejemplo, estar hecho de zafiro. En otra etapa, una capa adicional de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ se forma después encima de la capa de InN, en la ubicación correspondiente al patrón de superficie deseado 310. Métodos de deposición, incluyendo, por ejemplo, la deposición química de vapores organometálicos, MOCVD, y usando máscaras duras, para conseguir la formación de tales capas, se conocen como tales en la técnica.

[0045] La figura 8c es una vista lateral que muestra un ejemplo alternativo según el cual puede obtenerse la estructura mostrada en la figura 8a. Se proporciona una primera capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ en el sustrato de soporte 300, que corresponde al zafiro del ejemplo anterior. La primera capa puede tener un grosor de 4000 nm, por ejemplo. Una segunda capa de InN se forma encima de la primera capa, revistiendo de forma sustancial la primera capa íntegramente. El grosor de la segunda capa es preferiblemente menor que el grosor de la primera capa, y puede, por ejemplo, ser igual a aproximadamente 200 nm. El patrón de superficie deseado 310, al que las células en contacto deberían adherirse, se forma después eliminando de forma selectiva y localmente la capa fina de InN 320, exponiendo así la capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ situada allí debajo que promueve la adhesión.

[0046] Según una forma de realización de la invención, la eliminación de la capa superior de InN de la pila así formada se consigue mediante grabado selectivo, usando métodos litográficos conocidos en la técnica.

[0047] Según una forma de realización alternativa, la eliminación de la capa superior de InN se consigue mediante fresado directo usando un haz de iones. Este método presenta la ventaja de que se pueden conseguir patrones

que presentan crestas y surcos finos del orden de 1 micrómetro y que tienen una profundidad/altura de aproximadamente 2 micrómetros.

[0048] Usando las técnicas descritas anteriormente, se pueden formar varios patrones de superficie sobre un sustrato de un dispositivo implantable, como se muestra en la figura 9. El patrón de superficie puede comprender, por ejemplo, superficies de estructuras tridimensionales provistas en/sobre el sustrato. El patrón proporcionado por la primera parte 410 del sustrato 400, que comprende el material $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ y que se usa para ponerse en contacto directo con el tejido biológico, puede, por ejemplo, utilizarse para dirigir el crecimiento celular en una dirección predeterminada en el sustrato del dispositivo implantable. Por ejemplo, una parte de la superficie 410 de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ puede estar delimitada localmente por pilares 420' o estructuras de la pared de guía 420" de InN , que son biocompatibles, pero que no promueven la adhesión celular a los mismos. El crecimiento celular de las células que se adhieren a la primera parte 410 se promueve así a lo largo de la trayectoria delimitada por la segunda parte 420, 420', 420", que impone un límite físico a la adhesión celular. La dirección preferida del crecimiento celular inducido por las estructuras 420, 420', 420" se indica mediante flechas.

[0049] La figura 10 muestra un resultado experimental correspondiente, donde se muestra una neurona primaria humana (destacada en la figura) adherida a una primera parte del sustrato que comprende $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$. Un axón de la neurona crece a lo largo de la dirección que está determinada por la ubicación de los pilares de InN .

[0050] Los resultados de la figura 10 se han obtenido según el protocolo siguiente. Para evaluar el comportamiento de las neuronas primarias en un sustrato con patrón de InGaN , GaN o InN , se sembraron neuronas primarias humanas (InnoprotTM, España) según el protocolo del fabricante con 125 000 células/pocillo en una placa de cultivo de 48 pocillos que incluía los elementos con patrón. Los pocillos se recubieron con 1 ml de solución de gelatina estéril al 0,2 % durante 1 hora y se lavaron 3 veces con solución de agua estéril. Los diferentes elementos se lavaron en etanol, se enjuagaron con PBS y se colocaron en los pocillos. Se añadió 1 ml de suspensión celular en el medio neuronal libre de suero suplementado con un suplemento de crecimiento neuronal (InnoprotTM, España) y solución de penicilina/estreptomicina. El medio se cambió por medio fresco suplementado el día siguiente al establecimiento del cultivo y cada 3 días a partir de entonces. Después de 8 días de cultivo, los elementos se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron usando glutaraldehído al 2,5% en cacodilato de sodio durante 1h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en cacodilato de sodio, los elementos se deshidrataron en etanol (al 50%, al 70% y etanol absoluto) y se almacenaron en etanol al 100%. Para excluir un posible efecto del recubrimiento previo de gelatina relacionado con la liberación de gelatina en el medio de cultivo, el experimento se realizó con un subcultivo de células neuronales en una placa de 96 pocillos sin recubrimiento previo sobre elementos sin patrón. Se sembraron 23500 células en 200 microlitros de medio neuronal suplementado durante 8 días y se fijaron tal y como se ha descrito anteriormente y se secaron al aire. Los elementos se han visualizado finalmente usando microscopía electrónica de barrido.

[0051] Según una forma de realización adicional de la invención, se proporciona un dispositivo electrónico implantable, que comprende un sustrato que presenta como mínimo una superficie que tiene una parte que comprende $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, que se usa para ponerse en contacto directo con células o tejidos biológicos. La parte de la superficie que comprende $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ define un componente semiconductor del dispositivo, la banda prohibida del cual es una función de la proporción de Ga en el material $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$. La sensibilidad del componente semiconductor puede, por lo tanto, afinarse ajustando la proporción de Ga.

El dispositivo implantable comprende medios de procesamiento de señales que son, como tales, conocidos por el experto en la técnica y que no se detallarán con más detalle en el contexto de la presente descripción. Los medios de procesamiento de señales pueden comprender medios para amplificar o filtrar una señal recibida desde/transmitida por el componente semiconductor. Los medios de procesamiento de señales se conectan operativamente al componente semiconductor implementado por la parte de superficie de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, que contacta directamente con el tejido biológico.

La parte de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ de la superficie de sustrato puede, por lo tanto, usarse para transmitir una señal emitida por la célula o el tejido a los medios de procesamiento de señales o para transmitir una señal procesada a la célula o el tejido. En este último caso, el dispositivo implantable puede comprender, además, medios generadores de señales, tales como una fuente de corriente o de voltaje ajustable, y un medio de control/procesamiento apropiado como entrada a la ruta de procesamiento de señales. Tales medios son, como tales, conocidos por el experto.

En una forma de realización preferida, el dispositivo implantable comprende al menos un electrodo, preferiblemente dispuesto en un borde del mismo, para ponerse en contacto y estimular y/o monitorizar selectivamente las células/los tejidos en contacto.

El dispositivo implantable puede comprender, además, semiconductores funcionalizados, tales como unos transistores de efecto de campo, FET, o transistores de electrodo único, SET, para procesar o transmitir una señal recibida hacia o desde el dispositivo implantable. Los componentes descritos se proporcionan preferiblemente en un sustrato común del dispositivo implantable. En una forma de realización preferida, el dispositivo implantable puede ser un componente *in vivo* de una interfaz cerebro-máquina.

Debe entenderse que la descripción detallada de formas de realización preferidas específicas se da solo a modo de ilustración, ya que, para el experto, serán evidentes varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención. El alcance de la protección está definido por el siguiente conjunto de reivindicaciones.

Referencias

5 [0052]

[1] Santhanam G, Ryu SI, Yu BM, Afshar A, Shenoy KV, Nature 442:195-98 (2006).
 [2] Bellamkonda, R. V. Biomaterials 2006, 27 (19), 3515-3518.
 [3] Turner JN, Shain W, Szarowski DH, Andersen M, Martins S, et al., Exp. Neurol. 156:33-49 (1999).
 [4] Bellamkonda, R. V.; Pai, S. B.; Renaud, P. MRS Bulletin 2012, 37 (06), 557-561.
 10 [5] Grill, W. M.; Norman, S. E.; Bellamkonda, R. V. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2009, 11 (1), 1-24.
 [6] Li, X. D.; Wang, X. N.; Bondokov, R.; Morris, J.; An, Y. H. H.; Sudarshan, T. S. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials 2005, 72B (2), 353-361.
 [7] Szarowski DH, Andersen MD, Retterer S, Spence AJ, Isaacson M, Brain Res. 983:23-35 (2003).
 [8] Ito, T.; Forman, S. M.; Cao, C.; Li, F.; Eddy, C. R.; Mastro, M. A.; Holm, R. T.; Henry, R. L.; Hohn, K. L.;
 15 Edgar, J. H. Langmuir 2008, 24 (13), 6630-6635.
 [9] He, W.; McConnell, G. G.; Schneider, T. G.; Bellamkonda, R. G. Adv. Mater. 2007, 19 (21), 3529-3533.
 [10] Biocompatibility of semiconducting AlGaIn/GaN material with living cells, Podolska, A. et al. Sensors and Actuators B 169 (2012) 401-406.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo implantable que comprende un sustrato (100, 200, 300, 400) que tiene una superficie (102, 202), **caracterizado por el hecho de que**
 5 una primera parte (110, 210, 310, 410) de la superficie del sustrato, que se usa para ponerse en contacto directo con células o tejidos biológicos, comprende $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, donde x está en el intervalo de 0,001 a 0,999, donde la primera parte promueve la adhesión celular al sustrato y dirige el crecimiento celular sobre el mismo, y además define un componente semiconductor del dispositivo.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, donde x está en el intervalo de 0,01 a 0,88.
- 10 3. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la primera parte de la superficie cubre íntegramente la superficie del sustrato.
4. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la superficie (202) comprende además una segunda parte (220, 320, 420) que es distinta de dicha primera parte (210, 310, 410), donde dicha segunda parte (220, 320, 420) inhibe la adhesión celular al sustrato, y donde dicha segunda parte comprende nitruro de indio, InN.
 15
5. Dispositivo según la reivindicación 4, donde dichas primera (210) y segunda (220) parte cubren íntegramente la superficie (202) de dicho sustrato (200).
6. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el sustrato comprende nitruro de indio, InN.
7. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la primera y/o la segunda parte se proporcionan como una capa fina sobre dicha superficie del sustrato.
 20
8. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la primera y/o la segunda parte se proporcionan como una capa gruesa sobre dicha superficie del sustrato.
9. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la primera parte define un patrón sobre la superficie del sustrato, a lo largo del cual se mejora la adhesión celular.
- 25 10. Dispositivo según la reivindicación 9, donde dicho patrón comprende al menos una línea.
11. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde dicho patrón está delimitado por una serie de pilares que comprenden InN, dispuestos a lo largo de al menos una línea.
12. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el dispositivo comprende al menos un electrodo para estimular y/o monitorizar las células/los tejidos en contacto.
- 30 13. Dispositivo implantable para uso en un método para promover selectivamente la adhesión y el crecimiento de células sobre una parte de una superficie de un sustrato de un dispositivo implantable, donde dicha parte se usa para ponerse en contacto directo con células o tejidos biológicos, comprendiendo el método la etapa de formar una capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ sobre dicha parte, donde x está en el intervalo de 0,001 a 0,999.
14. Dispositivo para uso según la reivindicación 13, donde el método comprende las etapas de formar una primera capa de InN sobre un sustrato y, posteriormente, formar de manera selectiva una segunda capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$ encima de dicha primera capa, donde x está en el intervalo de 0,001 a 0,999.
 35
15. Dispositivo para uso según la reivindicación 13, donde el método comprende las etapas de formar una primera capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$, donde x está en el intervalo de 0,001 a 0,999, sobre un sustrato, formar posteriormente una segunda capa de InN encima de dicha primera capa, y eliminar posteriormente de manera selectiva partes de dicha segunda capa, para exponer la primera capa de $\text{In}_{(x)}\text{Ga}_{(1-x)}\text{N}$.
 40
16. Dispositivo para uso según la reivindicación 15, donde dicha segunda capa cubre dicha primera capa.

17. Dispositivo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, donde dicha segunda capa de InN se elimina selectivamente por grabado.

18. Dispositivo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 o 16, donde dicha segunda capa de InN se elimina selectivamente por fresado por haces iónicos.

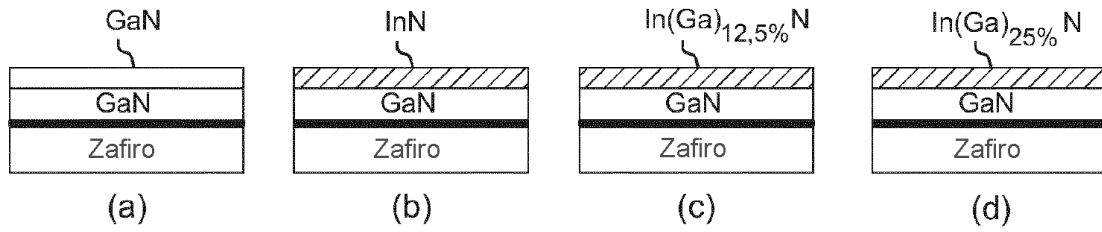


Fig. 1

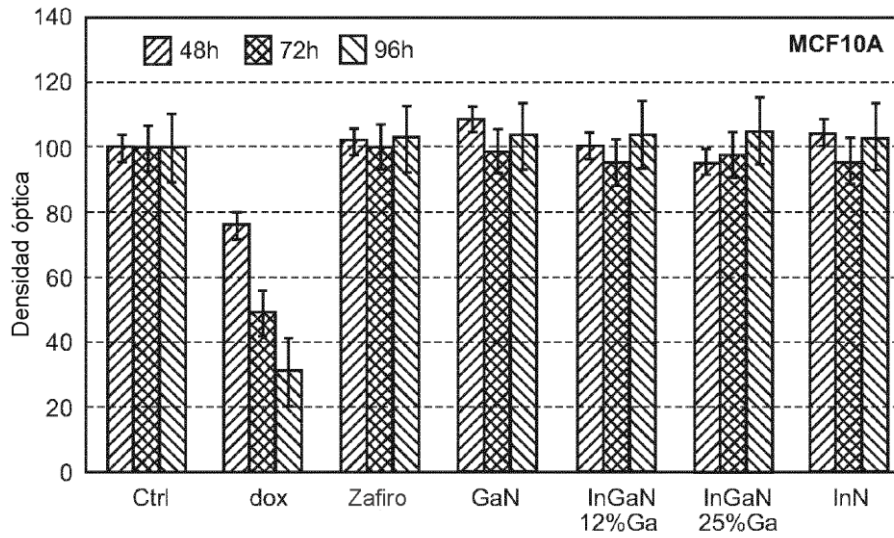


Fig. 2a

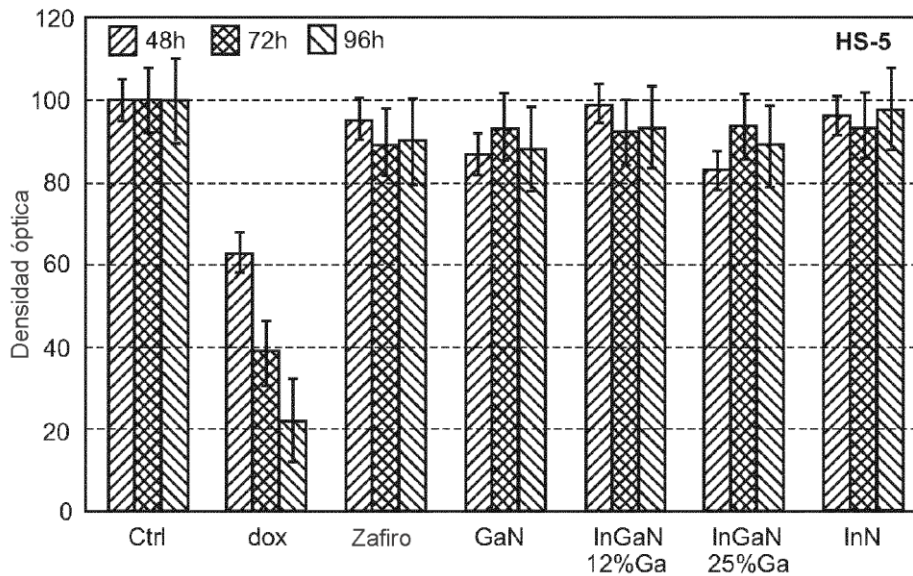


Fig. 2b

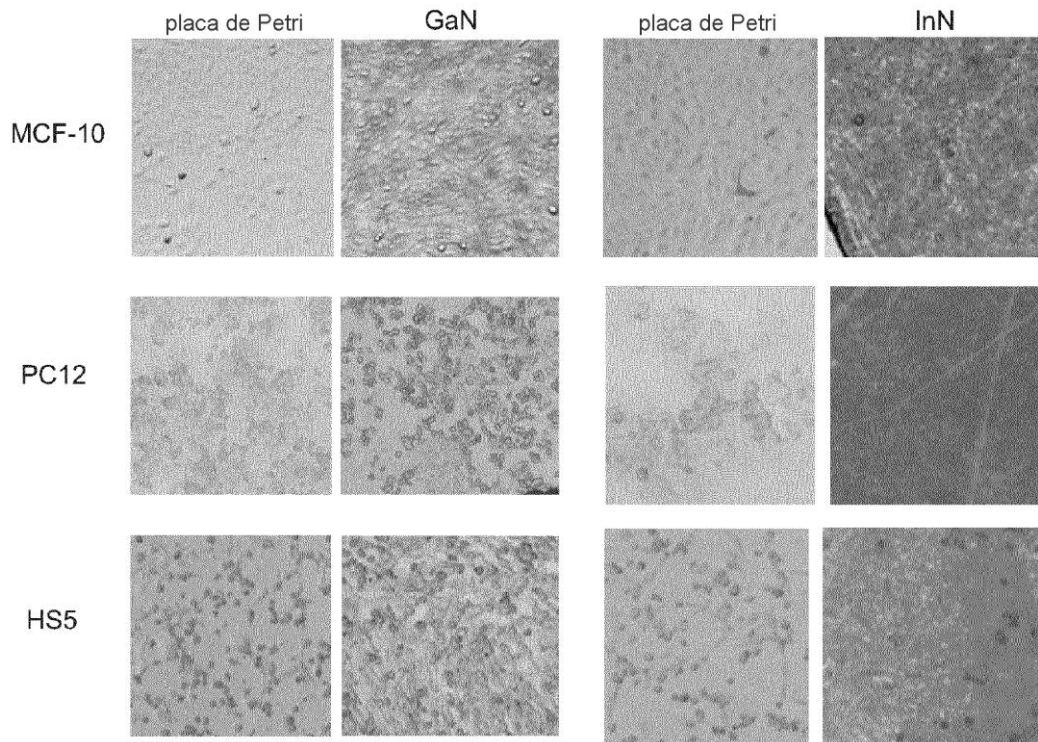


Fig. 3a

Fig. 3b

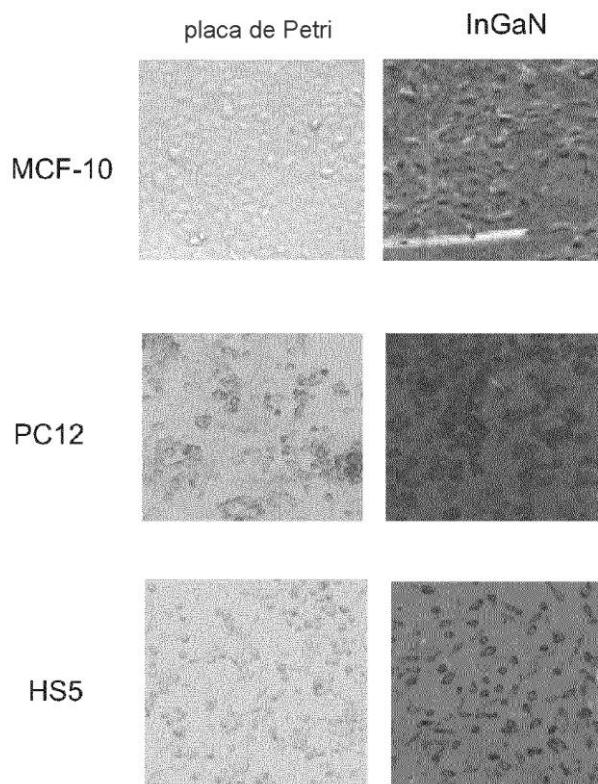


Fig. 3c

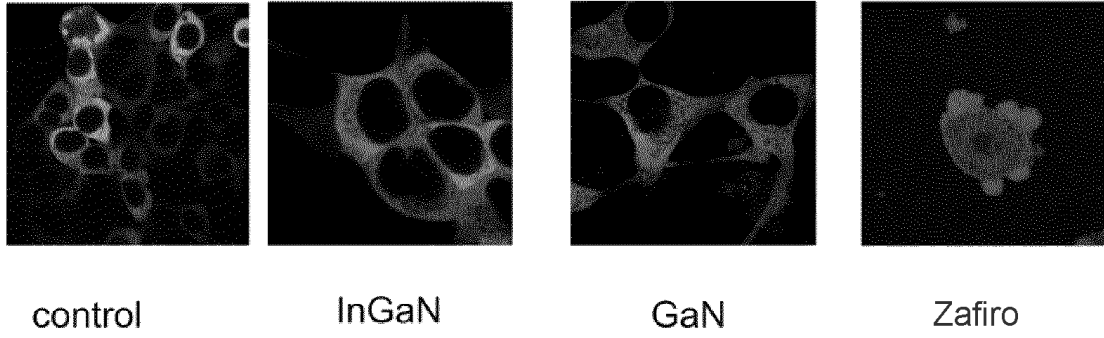
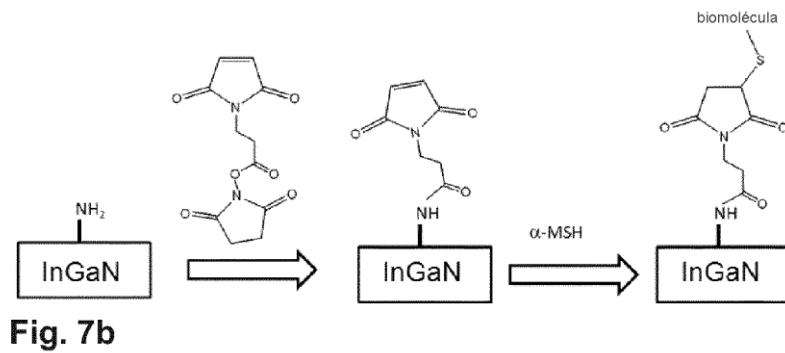
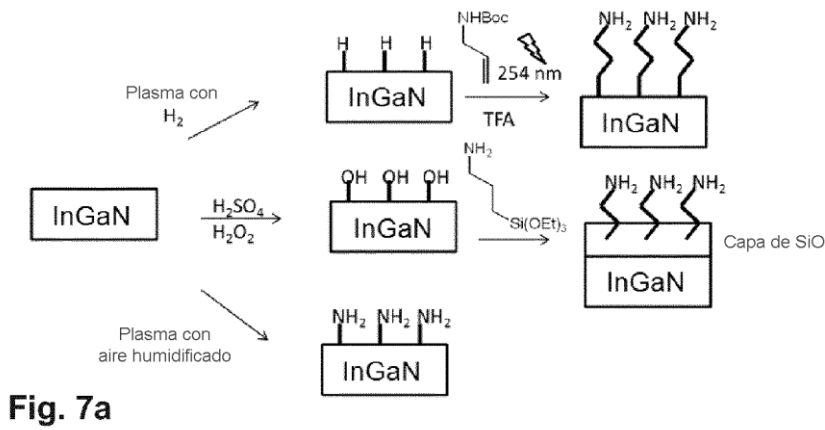
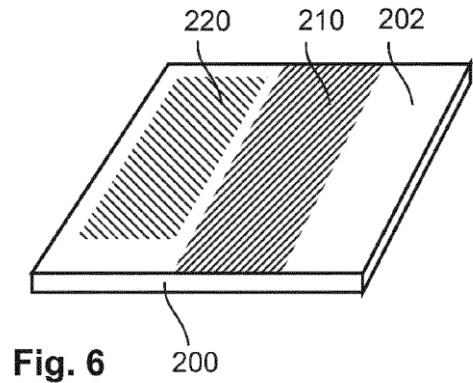
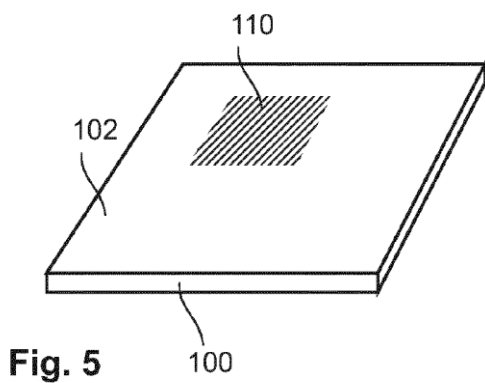


Fig. 4



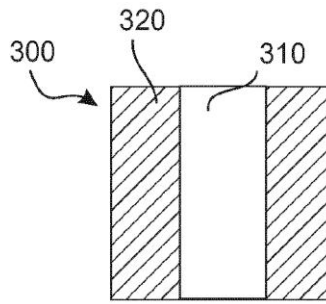


Fig. 8a

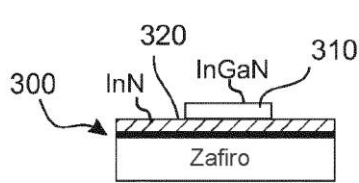


Fig. 8b

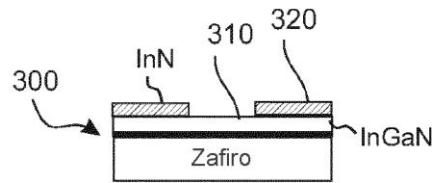


Fig. 8c

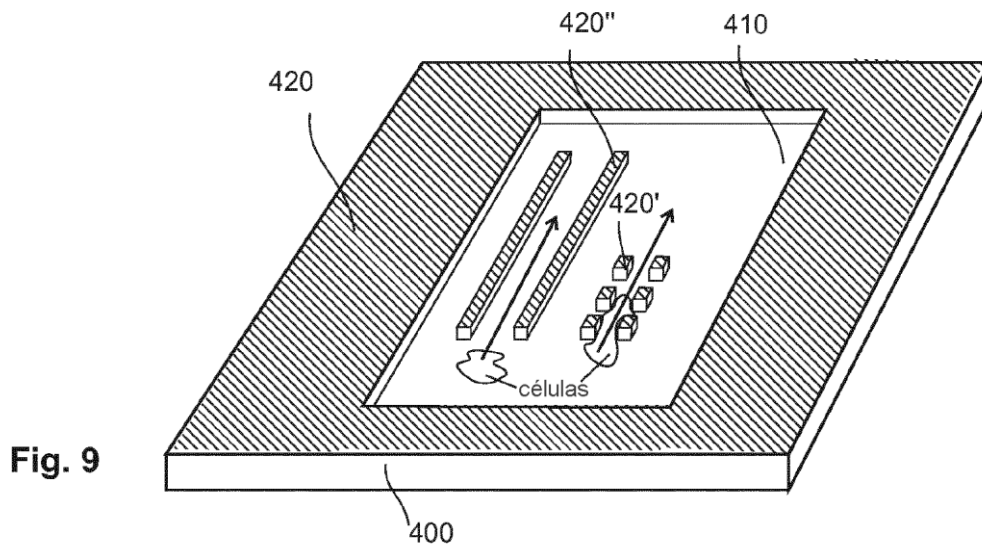


Fig. 9

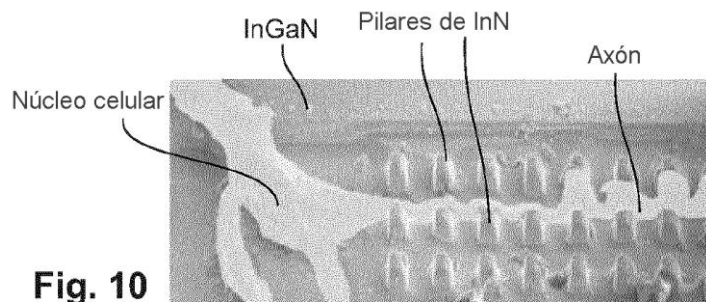


Fig. 10