

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 949**

21 Número de solicitud: 201930949

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

29.10.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.11.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

27.01.2020

Fecha de concesión:

24.06.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

01.07.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
(100.0%)**

**AVDA. RAMIRO DE MAEZTU Nº 7
28040 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**PÉREZ RIGUEIRO, Jose;
GUINEA TORTUERO, Gustavo Víctor;
GONZÁLEZ NIETO, Daniel y
RAMOS GÓMEZ, Milagros**

74 Agente/Representante:

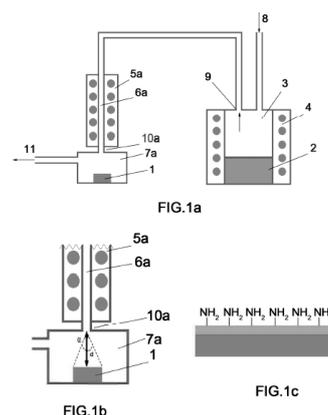
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UNA PRÓTESIS RECUBIERTA CON UN RECUBRIMIENTO FUNCIONAL Y CÉLULAS ADHERIDAS A DICHO RECUBRIMIENTO, ASÍ COMO LAS PRÓTESIS RECUBIERTAS OBTENIDAS POR ESTE PROCEDIMIENTO**

57 Resumen:

Procedimiento para obtener una prótesis recubierta con un recubrimiento funcional y células adheridas a dicho recubrimiento, así como las prótesis recubiertas obtenidas por este procedimiento.

Un procedimiento para obtener una prótesis recubierta que comprende las siguientes etapas: depositar una lámina funcionalizada con grupos reactivos sobre al menos parte de la superficie de una prótesis, donde la deposición tiene lugar mediante la técnica de silanización por vapor activado; inmovilizar al menos una molécula orgánica en la lámina depositada previamente para obtener un primer recubrimiento (funcional); y cultivar in vitro al menos un tipo de células sobre el primer recubrimiento, en condiciones que permiten la supervivencia, adhesión celular y, preferentemente, la diferenciación a linajes compatibles con el tejido huésped, dando lugar a la prótesis con un segundo recubrimiento (biológico) que comprende células adheridas al primer recubrimiento (funcional). Así como la prótesis recubierta obtenida por este procedimiento.



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 732 949 B2

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UNA PRÓTESIS RECUBIERTA CON UN RECUBRIMIENTO FUNCIONAL Y CÉLULAS ADHERIDAS A DICHO RECUBRIMIENTO, 5 ASÍ COMO LAS PRÓTESIS RECUBIERTAS OBTENIDAS POR ESTE PROCEDIMIENTO

SECTOR TÉCNICO

10 La invención se enmarca dentro del campo de los biomateriales y de la ingeniería de tejidos y, de modo particular, en los procedimientos desarrollados para mejorar la biocompatibilidad de estos materiales, al obtenerse una prótesis o implante que presenta en su superficie un recubrimiento formado por moléculas orgánicas, en particular compuestos activos farmacéuticos o biomoléculas, y células.

15 De forma más específica, el procedimiento que aquí se describe permite obtener una prótesis o implante que presenta un recubrimiento funcional que comprende una lámina funcionalizada con grupos reactivos y moléculas orgánicas capaces de interactuar con dicha lámina, en particular compuestos activos farmacéuticos o biomoléculas; y células adheridas a este recubrimiento funcional. De esta forma, la prótesis o implante obtenido por
20 este procedimiento comprende células de un linaje celular predeterminado antes de ser implantado en el organismo receptor.

Estas prótesis o implantes pueden utilizarse en el ámbito médico y veterinario.

25 ESTADO DE LA TÉCNICA

El objetivo de conseguir aumentar la esperanza de vida de la población y lograr alcanzar edades cada vez más avanzadas en las mejores condiciones implica el mantenimiento de un esfuerzo sostenido en el desarrollo de nuevas terapias que permitan resolver patologías
30 hasta ahora sin tratamiento, o que mejoren los tratamientos disponibles en la actualidad. Como consecuencia de este esfuerzo, el estudio de los biomateriales, en particular, de aquellos que puedan sustituir los tejidos orgánicos dañados por desgaste o traumatismo, ha adquirido un protagonismo notable. Dicho protagonismo se relaciona con la posibilidad que ofrece el uso de nuevos biomateriales de diseñar terapias más allá de la aproximación
35 tradicional basada en el empleo exclusivo de fármacos o, incluso, en la más novedosa en

que se combinan fármacos con células. En este contexto, la mejora de la biocompatibilidad de los biomateriales metálicos, cerámicos y poliméricos disponibles en la actualidad representa uno de los principales retos.

5 El paradigma actualmente aceptado para explicar el comportamiento biocompatible o no de un material asume un proceso de interacción entre el organismo y el implante que se desarrolla en dos etapas (Kao W.J., Evaluation of protein-modulated macrophage behaviour on biomaterials: designing biomimetic materials for cellular engineering, Biomaterials, 20 (1999) 2213-2221). En una primera etapa, inmediatamente después de la introducción del
10 implante en el organismo, se produce la adsorción de proteínas y otras moléculas sobre la superficie del material. Las proteínas adsorbidas, así como su conformación en el estado nativo o desnaturalizado, son reconocidas específicamente por receptores de membrana de diversos linajes celulares. Dicho reconocimiento desencadena una respuesta de aceptación/rechazo en las células que determinan la biocompatibilidad de la prótesis.

15

Sin embargo, e incluso si la presencia del biomaterial no conduce a una respuesta adversa por parte del organismo, la mayoría de las prótesis se encuentran rodeadas por una capa de tejido conjuntivo poco especializado (cápsula de tejido conjuntivo). La presencia de dicha cápsula no tiene consecuencias especialmente negativas a corto plazo, pero es uno de los
20 factores que limita la vida útil de muchas prótesis a menos de veinte años. Siguiendo el paradigma de la biocompatibilidad se encuentra que una posibilidad para extender la vida útil de las prótesis y, en general, para mejorar la reacción del organismo a las mismas aparece si se consigue una unión íntima del material con el tejido funcional que lo rodea.

25 Este enfoque para conseguir una mejora de la biocompatibilidad de los materiales ha dado lugar a diferentes tecnologías basadas en la modificación superficial de las prótesis. El análisis de los artículos científicos y de las patentes referidas a estas tecnologías permite establecer una primera clasificación, distinguiendo entre aquellas tecnologías en las que se considera un material polimérico o, en su defecto, la deposición de un recubrimiento
30 polimérico sobre el material de la prótesis y aquellas en las que la base del recubrimiento es una lámina delgada cerámica o metálica. Adicionalmente se encuentran documentos de patente (ver a continuación) en los que la tecnología desarrollada está relacionada con la generación de una capa funcional sobre el recubrimiento.

35 Dentro de los recubrimientos de tipo polimérico se encuentra la producción de hidrogeles

tales como los que aparecen descritos en la solicitud de patente US2006/0135476 (Medical device with coating that promotes endothelial cell adherence and differentiation, 2006), en los que la deposición de una matriz polimérica sobre el sustrato es el resultado de sumergir el material en una disolución que contiene las moléculas poliméricas. De esta manera es posible producir matrices de polímeros naturales, como colágeno o celulosa, o artificiales, tales como poliuretano y polietilenglicol. Alternativamente se han propuesto otras tecnologías basadas en la deposición de hidrogeles poliméricos sobre la superficie de los materiales, tales como las que se describen en las solicitudes de patente WO2006/105161 (Coated medical device, 2006) y WO2007/132099 (Method for constructing functional living materials, resulting materials and uses thereof, 2007). En la primera de estas solicitudes de patente el gel se forma a partir de polímeros naturales o artificiales con capacidad de adsorberse o adherirse a la superficie del material, incluyéndose la posibilidad de que dichos polímeros estén modificados químicamente de manera que contengan grupos reactivos. En la segunda, los hidrogeles se crean a partir de polisacáridos o péptidos biodegradables de manera que se produce una deposición secuencial de capas de estos polímeros con otras capas que contienen células. Un caso especialmente singular lo constituye la solicitud de patente WO2014/042463 (Synthetically designed extracellular microenvironment, 2014) en la que el material polimérico está constituido por proteína recombinante cuya secuencia está inspirada en el adhesivo del mejillón y que incluye motivos de secuencia característicos de proteínas de adhesión celular o factores de crecimiento.

Alternativamente a los recubrimientos poliméricos, se han desarrollado varias tecnologías cuyo objetivo es mejorar la biocompatibilidad de las prótesis mediante la deposición de recubrimientos cerámicos. La deposición de hidroxiapatita es uno de los procedimientos preferidos, aprovechando que la hidroxiapatita es la fase mineral de los huesos, lo que garantiza su biocompatibilidad. La deposición de la hidroxiapatita puede realizarse por precipitación del mineral a partir de una disolución con la composición adecuada, como se describe en la solicitud de patente US2015/0258242 (Mineralization and biological modification of biomaterial surfaces, 2015) o mediante un procedimiento electrolítico, tal como se describe en la solicitud de patente WO2018/047130 (Implantable medical devices having a coating layer with antimicrobial properties based on nanostructured hydroxyapatite, 2018). Una de las principales aplicaciones de estos recubrimientos cerámicos es la de ejercer un efecto antimicrobiano, como se describe en la anterior patente y también en US2003/0077381 (Antibiotic calcium phosphate coating, 2003). También se han presentado recubrimientos cerámicos para mejorar la biocompatibilidad con una composición diferente a

las apatitas incluyendo, por ejemplo, aluminato cálcico, tal como se describe en la solicitud de patente CA2647188 (Functionalized artificial bone and joint compositions and methods of use and manufacture, 2007) o un recubrimiento de carbono, que son posteriormente activados y funcionalizados (US2005/0079201;Implants with functionalized carbon surfaces, 5 2005).

Así mismo, en el estado de la técnica se han descrito diversos procedimientos que comprenden la unión de moléculas que modulen la reacción de las células del receptor al recubrimiento, bien sea polimérico o cerámico, aplicado sobre la prótesis. En el caso de los 10 polímeros se han desarrollado tecnologías que permiten unir a la superficie del polímero grupos reactivos aprovechando los grupos reactivos inicialmente presentes en el material, tal como se describe en US5350800 (Method for improving the biocompatibility of solid surfaces, 1993). En otros casos, la unión de las moléculas viene precedida por una etapa de activación de la superficie de manera que se generen en la misma grupos reactivos, tal 15 como se describe en las solicitudes de patente WO98/28026 (Reactive coatings, 1998) y US20110151139 (Method for selectively functionalizing non-modified solid surface and method for immobilizing active material on the functionalized solid surface, 2011). Los grupos reactivos creados en la superficie mediante su activación previa o, en el caso de los biomateriales poliméricos, aquellos inicialmente presentes en la composición del implante se 20 emplean para unir covalentemente diversas biomoléculas, generalmente péptidos o proteínas, tal como se describe en EP0554869 (Biomaterials of enhanced compatibility, 1993). Dentro de las moléculas empleadas para mejorar la biocompatibilidad de los implantes se puede destacar, por su originalidad, el empleo de péptidos bifuncionales, en los que una región del péptido tiene afinidad por la superficie que se desea funcionalizar y otra 25 región permite la unión covalente a diversas biomoléculas de interés, tal como se describe en AU2003301298 (Composition, method and use of bi-functional biomaterials, 2003).

En algunos casos se ha evaluado la interacción de los biomateriales modificados con células mediante cultivos celulares *in vitro*, como procedimiento para estimar la posible reacción 30 del organismo a dichos materiales tras su implante. Así, en la solicitud de patente US2010/0305696 (Hybrid soft tissue implants from progenitor cells and biomaterials, 2010) se presenta una tecnología consistente en formar un hidrogel de PEGDA en la que encapsular células de mamífero. Una tecnología alternativa se presenta en US2011/0275539 (Substrate for selecting and specifically influencing the function of cells, 35 2011) en la que sobre la superficie de un biomaterial, que puede ser vidrio, se generan

diferentes dominios mediante la formación de hidrogeles sobre la superficie. El objetivo de dichos hidrogeles es la modulación de las funciones de las células encapsuladas en los mismos, de manera que la tecnología pueda ser empleada para el análisis *in vitro* de la fisiología o de las posibles condiciones patológicas que afectan a las células objeto de estudio.

5

Como se ha indicado anteriormente, todas las estrategias descritas tienen como objetivo el de modular la reacción secuencial de determinados linajes celulares del receptor a la presencia del biomaterial desde el momento de su implante. Con objeto de evitar problemas generalmente asociados a las prótesis o implantes disponibles actualmente tales como, por ejemplo, su rechazo por parte del receptor, o la formación de la capa de tejido conjuntivo poco especializado (cápsula de tejido conjuntivo) rodeando la prótesis o implante, lo que suele acortar su vida útil, resultaría extremadamente útil conseguir esta modulación mediante la intervención de linajes celulares adecuados, introducidos de manera intencionada sobre la superficie del biomaterial con esta finalidad antes de la implantación de la prótesis. La consecución de este objetivo no es trivial, ya que implica la creación de una estructura que contenga células sobre la superficie del biomaterial lo que, a su vez, depende de la capacidad de generar un ambiente adecuado en el que dichas células se puedan desarrollar *in vitro* antes del implante de la prótesis.

10

15

20

Por otro lado, en el estado de la técnica se conoce la aplicación de la técnica de silanización por vapor activado (SVA o por sus iniciales en inglés, AVS, *Activated Vapour Silanization*), para generar recubrimientos biofuncionales (R.J. Martín-Palma et al., Surface biofunctionalization of materials by amine groups, J. Mater. Res. 19 (2004), 2415-2420) en un sustrato con una topografía superficial básicamente plana y con dimensiones del orden de un centímetro cuadrado; así como la inmovilización covalente de colágeno en un sustrato de titanio (Ti-6Al-4V) previamente funcionalizado mediante AVS (P. Rezvanian et al., Enhanced biological response of AVS-functionalized Ti-6Al-4V alloy through covalent immobilization of collagen, Scientific Reports 8 (2018), 3337). Sin embargo, la aplicación de la técnica AVS a la funcionalización de prótesis o implantes con las dimensiones usuales de hasta decenas de centímetros, pudiendo llegar a tener una superficie mayor a 30 cm², requiere el desarrollo de nuevos procedimientos e instalaciones no descritos en el estado de la técnica.

25

30

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

A continuación se describe un procedimiento que permite crear, de manera eficiente, una prótesis o implante con un recubrimiento (también denominado “segundo recubrimiento” o “recubrimiento biológico” en este documento) que comprende células adheridas a un primer recubrimiento funcional formado por una lámina funcionalizada con grupos reactivos y, al menos, una molécula orgánica depositada sobre dicha lámina, donde este recubrimiento biológico ocupa una superficie mayor a 1 cm², preferentemente mayor a 30 cm². Así, este procedimiento comprende una etapa donde las células son cultivadas *in vitro*, es decir, previamente a la implantación de la prótesis en el organismo, con objeto de mejorar la reacción del paciente a la prótesis tras el implante.

Los inventores han desarrollado un procedimiento que permite la generación de un recubrimiento biológico sobre la superficie extensa, en particular superior a 30 cm², del biomaterial que conforma la prótesis, donde este recubrimiento se forma con anterioridad al implante de la prótesis en el organismo. Dicho recubrimiento biológico se genera sobre una fracción apreciable de la superficie del implante o, incluso, sobre toda la superficie del mismo. El recubrimiento biológico está formado por la combinación de células y moléculas orgánicas, en particular biomoléculas, de manera que las células pueden proliferar y diferenciarse sobre la superficie del biomaterial. La presencia de este recubrimiento mejora la respuesta del organismo a la prótesis.

Así, la presente invención describe un procedimiento para obtener una prótesis con un recubrimiento, donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) depositar una lámina, preferentemente con un espesor de 20 nm a 1 μm, funcionalizada con grupos reactivos seleccionados del grupo que consiste en amino (-NH₂), carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), sulfhidrilo (-SH) y una combinación de los anteriores, sobre al menos parte de la superficie de una prótesis, donde la deposición tiene lugar mediante la técnica de silanización por vapor activado (SVA), y la superficie donde se deposita la lámina es mayor a 1 cm², preferentemente mayor a 30 cm²;
- b) inmovilizar al menos una molécula orgánica, preferentemente una biomolécula y/o un compuesto orgánico farmacéutico, en la lámina depositada en la etapa a) para obtener un primer recubrimiento (también denominado “recubrimiento funcional” en este documento); y

- c) cultivar *in vitro* al menos un tipo de células sobre el primer recubrimiento obtenido en la etapa b), en particular en condiciones que permiten la supervivencia y adhesión celular, dando lugar a un segundo recubrimiento (también denominado “recubrimiento biológico” en este documento) sobre al menos parte de la superficie de la prótesis.

5

Preferentemente la etapa c) comprende adicionalmente la diferenciación de las células cultivadas a linajes compatibles con el tejido huésped (receptor). Así, el procedimiento que se describe en este documento permite la diferenciación de las células sobre el recubrimiento funcional, a pesar de que ésta se produce en el entorno ofrecido por el material funcionalizado, un entorno significativamente diferente a la matriz extracelular tridimensional en la que las células se desarrollan en el interior del organismo del receptor, tanto desde el punto de vista de las biomoléculas que interactúan con las células como de la propia geometría bidimensional del sustrato.

15

En este documento se entiende que los términos “prótesis” e “implante” se utilizan como sinónimos. En ambos casos se está haciendo referencia a la pieza de material o de la combinación de materiales que se desea implantar en el organismo y cuya biocompatibilidad se trata de mejorar con el procedimiento de la presente invención. Así, la prótesis utilizada como sustrato en el procedimiento de la presente invención puede ser una pieza comercial producida en serie, o una pieza singular producida a pequeña escala; y puede estar formada por diversos materiales tales como metales, cerámicos o polímeros.

20

El método que se describe en este documento permite obtener una prótesis en cuyo exterior se genera un recubrimiento biológico formado por células y moléculas orgánicas, preferentemente biomoléculas, unidas al material que conforma la prótesis (soporte) mediante una lámina funcionalizada depositada mediante la tecnología SVA. Debido a este recubrimiento, la prótesis puede ser implantada en un paciente con el objetivo de reparar o sustituir tejidos dañados.

30

La principal propiedad de las prótesis de la presente invención tras la generación sobre las mismas del recubrimiento biológico que aquí se describe es la mejora en su biocompatibilidad, como consecuencia de la modificación de la interacción entre el organismo y la prótesis. Dicha mejora en la biocompatibilidad se puede reflejar en una disminución del rechazo al implante, una mejor interacción entre el implante y el tejido

35

circundante y un aumento de la vida útil de la prótesis. Todos estos factores contribuyen a una mejora de la calidad de vida general del paciente.

5 Sin estar ligado a ninguna teoría, los inventores consideran que la mejora en la respuesta del organismo al implante es el resultado de una interacción adecuada entre el tejido orgánico del receptor y la fase biológica creada en la superficie del biomaterial que conforma la prótesis. De esta manera, disminuyen las interacciones inespecíficas que se establecen entre el medio orgánico y el implante desnudo. En particular, la presente invención permite evitar la adsorción inespecífica de proteínas y otras biomoléculas sobre la superficie de la
10 prótesis una vez implantada y las respuestas celulares a la adsorción de dichas biomoléculas.

En realizaciones preferidas del procedimiento que se describe en este documento, la lámina funcionalizada con grupos reactivos se deposita sobre al menos una parte de la superficie
15 de la prótesis con una extensión mayor a 1 cm^2 , preferentemente mayor a 30 cm^2 , mediante un procedimiento que comprende:

- ai) evaporar un compuesto organometálico que contiene al menos un átomo de silicio y al menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en amino ($-\text{NH}_2$), carboxilo ($-\text{COOH}$), hidroxilo ($-\text{OH}$), sulfhidrilo ($-\text{SH}$) y una combinación de los anteriores;
- 20 aii) obtener al menos un flujo de vapor activado mediante calentamiento del vapor de compuesto organometálico de la etapa ai) a una temperatura entre 400 y $1000\text{ }^\circ\text{C}$, preferentemente en una región de activación con una salida hacia la cámara de deposición donde se encuentra la prótesis, de forma que la distancia entre la salida de la región de activación y la superficie de la prótesis es de 2 cm a 6 cm ;
- 25 aiii) hacer incidir uno o más flujos de vapor activado de la etapa aii) en al menos una parte de la superficie de una prótesis con una extensión mayor a 1 cm^2 , preferentemente mayor a 30 cm^2 , donde el ángulo de incidencia de los flujos de vapor activado respecto a la superficie de la prótesis a funcionalizar es de 0° a 50° , preferentemente de 0° a 30° , depositándose así una lámina funcionalizada con grupos reactivos seleccionados del grupo
30 que consiste en amino ($-\text{NH}_2$), carboxilo ($-\text{COOH}$), hidroxilo ($-\text{OH}$), sulfhidrilo ($-\text{SH}$) y una combinación de los anteriores sobre al menos parte de la superficie de la prótesis; donde las etapas aii) y aiii) tienen lugar de forma consecutiva.

El compuesto organometálico utilizado en el procedimiento de la presente invención está
35 formado por moléculas que poseen una estructura común en la que un átomo de silicio se

une a una o varias cadenas hidrocarbonadas, donde al menos una de estas cadenas comprende uno o varios grupos amino (-NH₂), hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH) o sulfhidrilo (-SH). En particular, el compuesto organometálico comprende una o más cadenas hidrocarbonadas -(CH₂)_n-, donde n es un número entre 1 y 30, preferentemente entre 1 y 6; y al menos un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), sulfhidrilo (-SH), amino (-NH₂) y una combinación de los anteriores. Las cadenas hidrocarbonadas del compuesto organometálico que se utiliza en el procedimiento que aquí se describe pueden comprender uno o varios enlaces dobles o triples entre átomos de carbono.

10

Como ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como compuesto organometálico para el proceso de silanización por vapor activado que se describe en este documento se encuentran el 3-aminopropiltrióxidosilano (APTES) y el aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), ambos conducentes a la formación de láminas que contienen grupos amino; el mercaptopropilmetoxisilano (MPTMS), con el que se producen láminas que contienen grupos sulfhidrilo; el ácido trietoxisililpropilmaleámico, con el que se producen láminas que contienen grupos carboxilo; y el óxido de N-trietoxisililpropil-O-polietileno, con el que se producen láminas que contienen grupos hidroxilo. Junto con la propia estructura de la molécula, una característica importante del organometálico es su punto de ebullición. En particular, se prefiere que la temperatura de ebullición de este compuesto se encuentre entre 100 °C y 250 °C.

20

La etapa ai) de evaporación se puede llevar a cabo depositando un fluido organometálico en una cámara de evaporación situada dentro de un horno de evaporación, de manera que se pueda variar la temperatura del compuesto organometálico. El aumento de la temperatura de la cámara de evaporación por encima del punto de ebullición del fluido organometálico conduce a la transición de fase líquido-vapor con la formación de vapor de organometálico dentro de la cámara de evaporación. Preferentemente, el rango de temperaturas al que se calienta el horno de evaporación se sitúa entre 50 °C y 400 °C, siendo aún más preferido que esta temperatura se encuentre entre 100 °C y 250 °C y, siendo especialmente preferido que la temperatura en la etapa ai) de evaporación sea entre 130 °C y 200 °C. El rango de temperaturas de evaporación dependerá del organometálico concreto, fijándose como límite máximo de la temperatura de dicho rango aquella en la que produce la descomposición de la molécula organometálica.

35

Es recomendable realizar esta etapa de evaporación con una presión inferior a 1 mbar, para evitar la reacción de las moléculas de organometálico con los gases atmosféricos, fundamentalmente oxígeno. La necesidad de calentar el organometálico durante la etapa de evaporación y, posteriormente, durante la etapa de activación crea una situación favorable para la oxidación del organometálico con el oxígeno atmosférico. Dicha reacción puede descomponer el organometálico, impidiendo la funcionalización del sustrato. Así, llevar a cabo el método, en particular las etapas ai), aii) y aiii) descritas en este documento, en un sistema de vacío que permita un vacío residual entre 10^{-4} y 10^{-1} mbar resulta ventajoso para evitar la descomposición mencionada anteriormente. Dicho vacío puede conseguirse con una bomba rotatoria acoplada a una trampa fría.

Preferentemente, la etapa aii) de obtención de al menos un flujo de vapor activado puede tener lugar calentando el vapor de compuesto organometálico a una temperatura entre 400 y 900 °C, más preferentemente entre 400 y 800 °C, ya que temperaturas demasiado elevadas favorecen la aparición de irregularidades e inhomogeneidades en las láminas depositadas.

La etapa de activación del vapor de organometálico puede llevarse a cabo en una instalación que comprende una cámara de deposición, donde se sitúa la prótesis que se desea funcionalizar, y otra región denominada región de activación, preferentemente en forma de tubo, conectada directamente con la cámara de deposición, y que presenta al menos una salida dirigida hacia la cámara de deposición, donde esta salida está configurada para permitir que el flujo de vapor activado incida en la superficie de la prótesis a funcionalizar con un ángulo entre 0° y 50° , preferentemente entre 0° y 30° , y una distancia entre la salida de la región de activación y la prótesis de preferentemente 2 cm a 6 cm. Según realizaciones particulares de esta instalación, la región de activación corresponde a la región del tubo inmediatamente anterior a la cámara de deposición y que conecta directamente con ella. Adicionalmente, la instalación comprende un horno de activación situado alrededor de la región de activación, definiendo su extensión y permitiendo un aumento controlado de temperatura en dicha región de activación. Así, en la región de activación, el vapor de organometálico evaporado en la cámara de evaporación atraviesa una región de temperatura elevada, antes de entrar en la cámara de deposición e incidir sobre la superficie de la prótesis a funcionalizar con el ángulo adecuado para poder realizar una funcionalización eficiente de al menos una parte de la superficie de una prótesis con una extensión mayor a 1 cm^2 , preferentemente con una extensión mayor a 30 cm^2 .

35

La aplicación de la técnica SVA a la funcionalización de prótesis, con unas dimensiones generalmente superiores a 1 cm^2 , requiere el desarrollo de procedimientos e instalaciones específicos para que la deposición de la lámina sobre la superficie de la prótesis a funcionalizar tenga lugar de forma homogénea y eficiente.

5

Así, en realizaciones especialmente preferidas de la presente invención, la funcionalización de áreas mayores a 1 cm^2 y, en particular, mayores a 30 cm^2 se puede conseguir mediante el procedimiento que se describe en este documento, donde la etapa aiii) tiene lugar en una instalación que comprende una cámara de deposición adaptada al tamaño y geometría de la prótesis a funcionalizar, de manera que los flujos de vapor activado se introducen en la cámara de deposición a través de diferentes entradas, conectadas cada una de estas entradas con la salida de una región de activación independiente, donde las salidas de las diferentes regiones de activación están configuradas de forma que el flujo de vapor activado incide sobre la superficie de la prótesis a recubrir con un ángulo entre 0° y 50° , preferentemente entre 0° y 30° , y donde la distancia entre la salida de cada una de estas regiones de activación y la superficie de la prótesis se mantiene fija en un valor establecido entre 2 cm y 6 cm (ver figura 2a).

Alternativamente, la etapa aiii) del procedimiento que aquí se describe puede tener lugar en una instalación como la descrita en el párrafo anterior, con la salvedad que la distancia entre la salida de las diferentes regiones de activación y la superficie de la prótesis a funcionalizar se puede modificar durante el procedimiento, por ejemplo, utilizando conectores flexibles de vacío como salidas de las regiones de activación (ver figura 2b). En este caso, la cámara de deposición tiene una geometría variable por lo que respecta a la distancia entre la salida de vapor activado y la superficie de la muestra a funcionalizar, de forma que es posible trabajar con diferentes geometrías y tamaños de prótesis en una sola cámara.

Preferentemente, en la etapa aiii) del procedimiento que se describe en este documento, el periodo de incidencia de los flujos de vapor de organometálico activado sobre al menos parte de la superficie de la prótesis se encuentra entre 1 y 120 minutos, más preferentemente entre 5 min y 30 min.

Sin estar ligado a ninguna teoría se cree que la funcionalización de la prótesis en realizaciones particulares de la presente invención es el resultado de la activación del vapor de organometálico, y la posterior incidencia de las moléculas así activadas en la parte de la

superficie de la prótesis a funcionalizar, resultando en la formación de una lámina, preferentemente con un espesor de 20 nm a 1 μm , más preferentemente de 20 nm a 300 nm. Un esquema de la instalación o equipo que se puede utilizar para llevar a cabo el proceso de funcionalización de la prótesis por silanización por vapor activado con una línea de vapor activado se muestra en la Figura 1(a), indicándose esquemáticamente el resultado del proceso de funcionalización en la Figura 1(b). Adicionalmente, en las figuras 2(a) y 2(b) se muestran esquemas de equipos adecuados para utilizar en aquellas realizaciones del procedimiento de la invención, donde la etapa aiii) comprende hacer incidir flujos de vapor activado independientes sobre diferentes zonas de la prótesis.

10

Aunque en el procedimiento que aquí se describe se prefiere depositar la lámina funcionalizada en toda la superficie externa de la prótesis. También es posible depositar una lámina funcionalizada con un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en amino ($-\text{NH}_2$), carboxilo ($-\text{COOH}$), hidroxilo ($-\text{OH}$), sulfhidrilo ($-\text{SH}$) y una combinación de los anteriores únicamente en parte de la superficie de la prótesis. Para ello se puede utilizar una máscara, por ejemplo, de fotolitografía, que permite dividir la superficie de la prótesis en diferentes secciones, de forma que se pueda funcionalizar únicamente una parte de la superficie de la prótesis o, alternativamente, depositar láminas con características diferentes y, en particular, con una funcionalidad diferenciada en diferentes secciones de la superficie de la prótesis.

20

Tal como se ha mencionado anteriormente, la etapa b) del procedimiento que se describe en este documento comprende inmovilizar al menos una molécula orgánica en la lámina depositada en la etapa a), preferentemente esta lámina tiene un espesor de 20 nm a 1 μm y, más preferentemente entre 20 nm y 300 nm. Para ello se hacen reaccionar los grupos reactivos presentes en la lámina depositada con al menos una molécula orgánica capaz de formar enlaces con estos grupos reactivos. De esta forma se genera un nicho adecuado que favorece la proliferación y, preferentemente, diferenciación celular, en al menos parte de la superficie de la prótesis.

30

Preferentemente, las moléculas orgánicas incorporadas al recubrimiento de la prótesis en la etapa b) del procedimiento que aquí se describe reaccionan con los grupos reactivos de la lámina funcionalizada mediante enlaces covalentes, u otro tipo de enlaces que presente una estabilidad equiparable. En particular, la estabilidad de la unión entre las biomoléculas y/o las moléculas orgánicas con la superficie de la prótesis es óptima mediante el

35

establecimiento de un enlace covalente con los grupos reactivos de la lámina funcional depositada en la etapa a).

5 El procedimiento que aquí se describe permite inmovilizar diferentes moléculas orgánicas, en particular principios activos farmacéuticos y/o biomoléculas, en la superficie de la prótesis donde se ha depositado la lámina funcional. Así, por ejemplo, la superficie de la prótesis, funcionalizada mediante SVA tal como se describe en este documento, se puede dividir en diferentes secciones, en particular secciones con un tamaño de 1 mm² a 10 cm², preferentemente de 1 cm² a 10 cm², con objeto de inmovilizar diferentes moléculas orgánicas en estas secciones.

10 En esta solicitud de patente debe entenderse que “principio activo farmacéutico” (también denominado “compuesto orgánico farmacéutico” en este documento) hace referencia a una sustancia química con efecto farmacológico.

15 La presencia de grupos reactivos en la superficie de la prótesis permite la unión covalente directa de biomoléculas y/o de otras moléculas orgánicas de menor tamaño, en particular compuestos activos farmacéuticos, es decir, sustancias químicas con efecto farmacológico, tales como, por ejemplo, antibióticos, con el material de la prótesis a través de los grupos reactivos presentes en ellas (hidroxilo (-OH), sulfidrilo (-SH), carboxilo (-COOH) y/o amino (-NH₂)). La mejora de la biocompatibilidad asociada con la presencia de estas moléculas orgánicas en la superficie de la prótesis depende de las funciones que estas moléculas desarrollan dentro del organismo. En particular, se pueden establecer las siguientes funciones:

25 - Prevención de infecciones. La inmovilización de moléculas antibióticas tiene como función adicional la eliminación de posibles patógenos presentes en la superficie de la prótesis, por lo que permite disminuir el riesgo de rechazo de la prótesis con recubrimiento objeto de esta invención.

30 - Modulación de la adhesión celular. La elección de la molécula inmovilizada en la lámina funcionalizada puede permitir modular la adhesión celular, mediante la interacción específica de las moléculas seleccionadas y los receptores de membrana presentes en las células. Esta modulación puede tener como objetivo una mejora de la adhesión de células funcionales, o con capacidad de diferenciar a células funcionales, es decir, de las

35

- células cultivadas *in vitro* en la etapa c) del procedimiento que aquí se describe. Como ejemplo de este tipo de modulación se encuentra la inmovilización de proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno, fibronectina o laminina. Con esta finalidad puede procederse a la inmovilización de la molécula completa, o únicamente de uno o
- 5 varios de los elementos o fragmentos que la componen. Como ejemplo de este segundo caso se tiene el motivo de secuencia RGD (Arginina-Glicina-Aspártico) característico de la secuencia de la fibronectina y que es reconocido por diversos receptores de membrana en las células. Entre las proteínas de la matriz extracelular se prefiere la inmovilización de fibronectina, ya que proporciona resultados óptimos en términos del
- 10 número total de células que se encuentran sobre la superficie y en el tamaño de las mismas.
- Alternativamente, la modulación puede tener como consecuencia una disminución de la adhesión celular, encontrándose el ejemplo más extremo en la producción de superficies
 - 15 con baja adhesión de bacterias. En particular, este objetivo puede obtenerse mediante la inmovilización de albúmina en la lámina funcional depositada en la superficie de la prótesis.
 - Mejora de la supervivencia, crecimiento y, eventualmente, diferenciación celular. Dentro
 - 20 del grupo de moléculas que pueden inmovilizarse para obtener una mejora de la supervivencia, crecimiento y, eventualmente, diferenciación celular en la prótesis recubierta de la presente invención, se encuentran moléculas de señalización celular tales como factores de crecimiento, en particular, el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento neuronal (NGF) o el factor de crecimiento endotelial vascular (VGEF); así como citoquinas, biomoléculas anti-inflamatorias y angio-génicas, y otras
 - 25 moléculas solubles que median la señalización celular a través de diversos receptores. Así, estas moléculas pueden encontrarse tanto en el medio de cultivo utilizado en la etapa c), como inmovilizadas en la lámina funcionalizada depositada en la superficie de la prótesis. En este segundo caso, las moléculas se unen a la lámina funcionalizada
 - 30 preferentemente a través de agentes entrecruzantes biodegradables, de manera que la liberación de las biomoléculas al medio se puede realizar de una manera controlada y con una cinética conocida. Como ejemplo de agentes entrecruzantes biodegradables se encuentran los péptidos sensibles a proteasas, tales como los hexapéptidos Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly y Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Gly. En ambos casos, la metaloproteasas II (MMP-2)

y 9 (MMP-9) inducen la rotura específica del enlace peptídico entre los residuos de glicina y leucina.

5 Si bien la presencia de grupos funcionales reactivos tanto en la lámina depositada en la superficie del material como en las moléculas a inmovilizar en esta lámina puede permitir la creación de un enlace covalente directo entre ambos elementos, la formación de dicho enlace covalente resulta más eficiente mediante el empleo de al menos un agente entrecruzante.

10 Los agentes entrecruzantes son moléculas orgánicas que contienen típicamente dos grupos funcionales y una región espaciadora. Los agentes entrecruzantes favorecen la reacción entre los grupos reactivos de la lámina funcionalizada y los grupos reactivos de las biomoléculas y/o moléculas orgánicas que se desea inmovilizar sobre esta lámina. Si el propio agente entrecruzante no actúa de nexo entre la lámina y la molécula, se denomina de longitud nula. Frecuentemente el agente entrecruzante constituye una parte estable del sistema junto con la lámina funcionalizada y las moléculas orgánicas a inmovilizar al permitir la unión covalente entre ambos elementos. Como ejemplo de un agente entrecruzante de longitud nula se encuentra el EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) que permite la creación de un enlace covalente (enlace peptídico) entre un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). Como ejemplo de un agente entrecruzante de longitud no nula se encuentra el glutaraldehído, que permite la unión covalente de dos grupos amino. Para algunas aplicaciones pueden utilizarse agentes entrecruzantes que sufren una degradación espontánea o dependiente de las condiciones del entorno, de manera que permiten la liberación de las biomoléculas o moléculas orgánicas inicialmente unidas de manera covalente a la lámina funcionalizada depositada en la prótesis. Este último aspecto resulta muy interesante para la liberación controlada de fármacos y distintas biomoléculas, pudiendo alternarse regiones de la superficie de la prótesis donde se empleen agentes entrecruzantes biodegradables, por ejemplo, para liberar factores de crecimiento que favorecen el desarrollo de las células en la superficie de la prótesis, y otras en las que los enlaces sean estables, por ejemplo, para unir biomoléculas que modulen la adhesión celular.

35 Cuando la molécula a inmovilizar es una biomolécula y, en particular, una proteína, en la etapa b) del procedimiento que aquí se describe se prefiere la utilización del sistema formado por EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida)

como entrecruzante. Estos compuestos no se integran en la estructura formada por la lámina funcionalizada y la biomolécula y, por tanto, este sistema se considera de longitud nula. Un ejemplo del resultado de emplear el sistema EDC/NHS como agentes entrecruzante para unir covalentemente una proteína a una superficie biofuncionalizada se presenta en la Figura 3.

En realizaciones particulares de la presente invención, el procedimiento que aquí se describe puede comprender una etapa de limpieza de la superficie de la prótesis con el recubrimiento funcional, es decir, tras la etapa b) del procedimiento. La inclusión de esta etapa de limpieza permite eliminar restos de agente entrecruzante que puedan dar lugar a un efecto tóxico sobre las células. En particular, cuando se utiliza el sistema formado por EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida) como entrecruzante, esta etapa de limpieza comprende varias sub-etapas de incubación de la prótesis funcionalizada con al menos una molécula orgánica inmovilizada (prótesis con un primer recubrimiento funcional) con diferentes soluciones, en particular, tampón PBS (tampón fosfato salino), tampón MES (es decir, tampón de ácido 2-(N-morforlin)etanosulfónico) y/o DMEM (conocido en inglés como *Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

En realizaciones particularmente preferidas, la etapa de limpieza se lleva a cabo siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

bi) limpiar la prótesis con el primer recubrimiento con agua destilada, preferentemente inmediatamente después de retirar la solución de agente entrecruzante;

bii) incubar la prótesis con tampón PBS (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, NaCl 137 mM, KCl 27 mM; pH=7.4) durante un periodo entre una y cuatro, preferentemente durante 2 horas; donde esta etapa de incubación se realiza n veces, siendo n un valor entre 1 y 4, preferentemente n es igual a 2;

biii) incubar la prótesis obtenida tras la etapa bii) con tampón MES (0.2 M; pH=6.0) durante un periodo entre 24 h y 96 h, preferentemente durante 72 horas; donde esta etapa de incubación se realiza l veces, siendo l un valor entre 1 y 4, preferentemente l es igual a 2;

biv) incubar la prótesis en DMEM (1x) durante un periodo entre 6 y 24 horas, preferentemente durante 12 horas; donde esta etapa de incubación se realiza m veces, siendo m un valor entre 1 y 4, preferentemente m es igual a 2.

Un procedimiento alternativo para la unión estable de biomoléculas a la lámina depositada en la superficie de la prótesis lo ofrece la interacción en el sistema estreptavidina-biotina (o, alternativamente, avidina-biotina). La unión estreptavidina-biotina, pese a no tratarse propiamente de un enlace covalente, resulta ser de una intensidad comparable. En este
5 contexto, es posible unir moléculas de estreptavidina de manera covalente a los grupos funcionales de la lámina depositada en la superficie de la prótesis, uniendo en un proceso que se desarrolla en paralelo, moléculas de biotina a las biomoléculas que se desea inmovilizar sobre la lámina funcionalizada (biotinización de biomoléculas). La incubación de
10 la mencionada lámina funcionalizada con estreptavidina inmovilizada de forma covalente con el medio de biomoléculas biotinizadas provoca la inmovilización de dichas biomoléculas sobre la lámina depositada en la superficie de la prótesis

Las modificaciones realizadas sobre al menos parte de la superficie de la prótesis en las etapas a) y b) tienen como objetivo la creación de un nicho que permita la supervivencia,
15 crecimiento y, eventualmente, la diferenciación de los linajes celulares deseados *in vitro* antes de proceder al implante de la prótesis en el organismo, así como mejorar la supervivencia de las mismas con posterioridad a la introducción de la prótesis en el organismo.

20 De forma similar a lo indicado en relación con las etapas anteriores, el procedimiento que se describe en este documento permite cultivar diferentes linajes celulares en diferentes secciones de la superficie de la prótesis.

La elección del linaje celular dependerá, en cada caso, del tipo y de la función de la prótesis
25 y, de manera particular, del tipo de tejido que entrará en contacto directo con la prótesis tras el implante. A su vez, la elección del linaje celular y el desarrollo que se induce sobre la superficie de la prótesis (supervivencia, crecimiento y/o diferenciación) determina las biomoléculas y/o moléculas orgánicas inmovilizadas sobre la superficie funcionalizada en la etapa b) del procedimiento. Tal como se ha mencionado anteriormente, dichas moléculas
30 permiten modular el comportamiento de las células sobre la superficie de la prótesis. Adicionalmente, el cultivo celular de las células implicará la adición de un medio de cultivo con una composición determinada en función del tipo de desarrollo que se desee obtener en las células.

Si bien no existen en principio restricciones a los linajes celulares que es posible utilizar en el marco de la presente invención, se prefiere utilizar linajes de células pluri- y multi-potentes, ya que ofrecen la potencialidad de crear tejido especializado sobre la prótesis.

5 En particular, se prefiere la utilización de células madre multi-potentes como, por ejemplo las células de origen mesenquimal procedentes de médula ósea (BM-MSK) y las células del linaje osteocondroreticular (OCR). Estas células pueden cumplir una serie de funciones complementarias entre las que se encuentran la limitación del proceso inflamatorio asociado a la introducción del implante dentro del organismo, la promoción de la creación de tejido sano en el entorno de la prótesis e, incluso, la diferenciación directa de las células multi-potentes cultivadas sobre la superficie a diferentes tejidos, tales como los tejidos óseo, cartilaginoso, adiposo o muscular.

15 Como fuente de las células es preferible utilizar las células del propio paciente (origen autólogo), ya que este procedimiento disminuye considerablemente la posibilidad del rechazo. Alternativamente se puede utilizar células de un donante humano (alotransplante). No obstante, en el caso de las células madre mesenquimales, su carácter inmunosupresor y su limitada inmunogenicidad facilita el implante de prótesis de forma autóloga y alogénica.

20 Un aspecto particularmente ventajoso del procedimiento que se describe en este documento es que permite no sólo el crecimiento de las diversas células, sino también logra su diferenciación hacia diversas estirpes celulares, un aspecto basado en la capacidad que tienen las células pluri-potentes y multi-potentes de generar prácticamente cualquier población celular. Así, la prótesis con el recubrimiento biológico que se obtiene por este procedimiento ofrece la posibilidad de crecer células pluri-potentes naturales, como son las células madre pluri-potentes inducidas que pueden ser obtenidas mediante reprogramación basada en métodos integrativos (con ADN recombinante) o no integrativos (ARN, proteínas recombinantes o simple incubación con factores). También es posible crecer células madre multi-potentes de los linajes mesodermo, endodermo, ectodermo; y lograr, al igual que con 25 las células madre pluripotentes, su diferenciación a diferentes poblaciones de células diferenciadas.

35 Adicionalmente, la presente invención permite reprogramar de forma directa células ya diferenciadas, de tal manera que se generen otras estirpes celulares sobre la prótesis con recubrimiento biológico. Por ejemplo, para generar tejido nervioso es posible crecer

fibroblastos humanos sobre la prótesis funcionalizada con un recubrimiento que comprende una lámina funcionalizada y moléculas orgánicas, en particular biomoléculas, inmovilizadas en dicha lámina. Estos fibroblastos pueden ser transducidos con determinados factores para generar neuronas de tipo glutamatérgico y GABAérgico (factores ASCL1, BRN2, MYT1L),
5 neuronas de tipo dopaminérgico (ASCL1, NURR1, LMX1A), astrocitos maduros (factores NFIA, NFIB, and SOX9), oligodendrocitos o células formadoras de mielina (factores sox10, Olig2, Nkx6-2) y células endoteliales para la producción de vasos sanguíneos (factores ER71/ETV2).

10 Adicionalmente, la utilización de células madre multi-potentes de origen mesenquimal procedentes de médula ósea (BM-MSC) permite que las células se diferencien a varias estirpes celulares sobre la prótesis que se obtiene por el procedimiento que aquí se describe. En particular, para prótesis óseas resulta conveniente la diferenciación de las células BM-MSC a osteoblastos, mientras que para prótesis articulares resulta conveniente
15 la diferenciación de dichas células a condrocitos, así como la diferenciación de las células BM-MSC a células musculares.

Otro aspecto de la presente invención es la prótesis recubierta (también denominada prótesis con recubrimiento biológico en este documento) obtenida por el procedimiento que
20 se describe en este documento.

En realizaciones preferidas, esta prótesis recubierta comprende:

- una prótesis con al menos una superficie de material biocompatible, preferentemente metálico, cerámico o polimérico;
- 25 - un primer recubrimiento (también denominado “recubrimiento funcional”) que comprende:
 - o una lámina funcionalizada con grupos reactivos seleccionados del grupo que consiste en amino (-NH₂), carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), sulfhidrilo (-SH) y una combinación de los anteriores, preferentemente esta lámina tiene un
30 espesor entre 20 nm y 1 μm, más preferentemente entre 20 nm y 300 nm, depositada en al menos una parte de la superficie de la prótesis con una extensión mayor a 1 cm², más preferentemente mayor a 30 cm²; y
 - o al menos una molécula orgánica, preferentemente fibronectina, inmovilizada en la lámina funcionalizada; y

- un segundo recubrimiento (también denominado “recubrimiento biológico”) que comprende células pluri-potentes o multi-potentes adheridas al primer recubrimiento.

De forma particular, las células adheridas al recubrimiento funcional son preferentemente células mesenquimales BM-MSK que tienen capacidad de diferenciarse a linajes especializados tales como osteoblastos y condrocitos. Este tipo de prótesis son particularmente ventajosas para utilizar como prótesis en aplicaciones traumatológicas.

En realizaciones preferidas, la diferenciación de células BM-MSK a condrocitos puede tener lugar utilizando un medio de cultivo DMEM suplementado con 5 a 10% de suero fetal bovino (SFB) y enriquecido con una serie de complementos que pueden ser un medio basal insulina-transferrina-selenio, piruvato sódico, dexametasona, ácido ascórbico, factores de crecimiento transformante, L-Glutamina, y antibióticos como la penicilina o/y estreptomicina.

15 **Breve descripción de las figuras**

Las Figuras incluidas en el documento de la solicitud de patente son:

Figura 1a: Esquema del dispositivo (también denominado “instalación” en este documento) que se puede utilizar para la etapa a) de silanización por vapor activado (SVA) con un único flujo de vapor activado, donde se indican los principales elementos constituyentes de este dispositivo:

- Una cámara de evaporación (3), donde se encuentra situado el compuesto organometálico (2) durante el procedimiento de la invención. Esta cámara está al menos parcialmente rodeada por un horno de evaporación (4), tiene una entrada (8) de gas portador (por ejemplo, argón) y una salida (9) de vapor de compuesto organometálico (9).
- Una región de activación (6a) conectada a la cámara de evaporación (3) de forma que el vapor de compuesto organometálico puede circular desde la mencionada cámara de evaporación (3) a la región de activación (6a), una salida (10a) del flujo de vapor activado generado en esta región durante el procedimiento de la invención, y un horno de activación (5a) que recubre al menos parcialmente la región de activación (6a). En el caso preferido que se muestra en la figura 1a, la región de activación (6a) es un tubo por donde circula vapor de compuesto organometálico, dando lugar al flujo de vapor activado a la salida (10a) de la región de activación.

- Una cámara de deposición (7a), donde se encuentra situada la prótesis (1) a recubrir, conectado a la salida (10a) de la región de activación de forma que el ángulo de incidencia (α) del flujo de vapor activado en la superficie de la prótesis a recubrir se encuentra entre 0° y 50° , y la distancia (d) entre la salida (10a) y la superficie de la prótesis a recubrir se encuentra preferentemente entre 2 cm y 6 cm.
- Opcionalmente, la cámara de deposición (7a) puede estar conectada a una bomba de vacío (11), tal como se muestra en la figura 1a.
- Adicionalmente, la cámara de deposición (7a) puede comprender un portamuestras motorizado (no mostrado en la figura), para modificar la orientación de la prótesis (1) con respecto a la única entrada de flujo de vapor activado desde la salida (10a) de la región de activación.

Figura 1b: Esquema ampliado de la salida (10a) de la región de activación (6a) a la cámara de deposición (7a) que contiene la prótesis (1) a recubrir, donde se representa que el ángulo de incidencia (α) del flujo de vapor activado en la superficie de la prótesis (1) a recubrir se encuentra entre 0° y 50° , y la distancia (d) entre la salida (10a) y la superficie de la prótesis a recubrir, preferentemente entre 2 cm y 6 cm.

Figura 1c: Esquema del resultado de un proceso de silanización por vapor activado, empleando 3-aminopropiltriétoxilano (APTES) como fluido organometálico, que resulta en la deposición de una lámina delgada con grupos amino (NH_2) en superficie.

Figura 2a: Esquema de parte del dispositivo que se puede utilizar para la etapa a) de silanización por vapor activado (SVA), cuando varios flujos independientes de vapor activado inciden sobre la prótesis. Tal como se muestra en esta figura, este dispositivo es similar al mostrado en la figura 1a, con la salvedad que la cámara de deposición (7b) está conectada a más de una región de activación (6b), cada una de estas regiones tiene una salida (10b) del flujo de vapor activado generado durante el procedimiento de la invención, y un horno de activación (5b) que recubre al menos parcialmente la región de activación (6b). Aunque no se muestra en esta figura, cada una de estas regiones de activación (6b) puede estar conectada a la misma o a diferentes cámaras de evaporación, de forma que el vapor de compuesto organometálico puede circular desde la(s) mencionada(s) cámara(s) de evaporación a las regiones de activación (6b) y, posteriormente, a la cámara de deposición (7b). En el caso preferido que se muestra en la figura 2a, el dispositivo consta de 5 regiones de activación (6b), todas ellas en forma de tubo por donde circula vapor de compuesto

organometálico, dando lugar a diferentes flujos de vapor activado a las salidas (10b) de las regiones de activación. Adicionalmente, la cámara de deposición (7b) puede comprender un portamuestras motorizado (no mostrado en la figura), para modificar la orientación de la prótesis (1) con respecto las entradas de flujo de vapor activado desde la salida (10b) de las regiones de activación.

De forma análoga a la realización anterior, la cámara de deposición (7b), donde se encuentra situada la prótesis (1) a recubrir, está conectada a las salidas (10b) de las regiones de activación de forma que el ángulo de incidencia (α) del flujo de vapor activado en la superficie de la prótesis a recubrir se encuentra entre 0° y 50° , y la distancia (d) entre cada una de las salidas (10b) y la superficie de la prótesis a recubrir se mantiene fija durante el procedimiento en un valor, preferentemente, entre 2 cm y 6 cm.

Figura 2b: Esquema de parte del dispositivo que se puede utilizar para la etapa a) de silanización por vapor activado (SVA), cuando varios flujos independientes de vapor activado inciden sobre la prótesis. El sistema que se muestra en esta figura es el mismo representado en la figura 2a, con la salvedad que las salidas (10c) de las regiones de activación (6c) son flexibles, en particular, conexiones flexibles de vacío, de forma que distancia (d) entre cada una de las salidas (10c) y la superficie de la prótesis a recubrir (1) se puede modificar durante el procedimiento en un valor, preferentemente, manteniéndola en todo momento entre 2 cm y 6 cm. Esta configuración permite utilizar una única cámara de activación para funcionalizar diferentes prótesis en términos de su geometría y tamaño.

Figura 3: Representación esquemática de la unión covalente que se establece entre los grupos $-\text{NH}_2$ de una lámina funcionalizada con los grupos $-\text{COOH}$ de una proteína (indicada por P en la Figura) mediante el empleo de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y de N-hidroxisuccinimida (NHS) como agentes entrecruzantes.

Figura 4: Resultado de aplicación de las diferentes etapas del procedimiento a una muestra de Ti6Al4V. (A) Imagen de microscopía de fuerza atómica de la muestra control de Ti6Al4V. (B) Imagen de fuerza atómica de una muestra no funcionalizada mediante SVA, incubada con EDC/NHS y fibronectina y sometida posteriormente a un lavado con una disolución acuosa de detergente (SDS). (C) Imagen de microscopía de fuerza atómica de una muestra funcionalizada mediante SVA, incubada con EDH/NHS y fibronectina y sometida posteriormente a un lavado con una solución acuosa de detergente (SDS). Se observa la

presencia de la proteína sobre la superficie después del proceso de lavado. (D) Imagen de un cultivo celular de células madre mesenquimales procedentes de médula ósea (BM-MSC) sobre una superficie funcionalizada mediante SVA y a la que se ha unido covalentemente fibronectina. La imagen se ha tomado con un microscopio de fluorescencia después de teñir las células con el colorante vital calceína denotando la viabilidad del cultivo celular sobre la superficie funcionalizada.

Figura 5: Crecimiento de las células BM-MSC sobre Ti6Al4V tras 48 horas de cultivo observado mediante microscopía de fluorescencia utilizando el marcador faloidín/Hoechst. (A) Muestra de Ti6Al4V control. (B) Muestra de Ti6Al4V funcionalizada mediante SVA a la que se ha unido covalentemente fibronectina, empleando como agentes entrecruzantes EDC/NHS.

Figura 6: Efecto del recubrimiento con fibronectina sobre la adhesión de células BM-MSC sobre Ti6Al4V. Células BM-MSC se cultivaron sobre control (plástico) (figuras 6A (0 min) y 6B (1 min)), Ti6Al4V sin funcionalizar (figuras 6C (0 min) y 6D (1 min)) y Ti6Al4V funcionalizado con fibronectina siguiendo el procedimiento que se describe abajo (figuras 6E (0 min) y 6F (1 min)). Las muestras fueron tratadas con tripsina durante el tiempo indicado (0 min o 1 min) y se comparó el número de células sobre cada uno de los materiales. Se observa cómo después de la incubación con tripsina durante un minuto no quedan células sobre la superficie del Ti6Al4V no funcionalizado (figura 6D), en contraste con el mantenimiento de un número apreciable de células tanto en el control como en el Ti6Al4V funcionalizado con fibronectina (figura 6F).

Figura 7: Diferenciación de células BM-MSC a condrocitos sobre la superficie de Ti6Al4V funcionalizado con fibronectina. Se comparan BM-MSC cultivados sobre plástico (control) (figuras 7A y 7B) y sobre Ti6Al4V funcionalizado con fibronectina (figuras 7C y 7D). Las células se observan tras 10 días de cultivo en medio de proliferación similar al empleado en los cultivos celulares de las Figuras 5 y 6 (figuras 7A y 7C) o en medio de diferenciación (figuras 7B y 7D). Se ha empleado la tinción de Hoescht para identificar las células (azul) y un anticuerpo anti-agrecano monoclonal para identificar la deposición de agrecano, revelado con un anticuerpo fluorescente anti-IgG de ratón (rojo), como actividad característica de los condrocitos. Se observa una densidad mayor de depósitos de agrecano sobre la muestra de Ti6Al4V funcionalizada con fibronectina (figura 7D) comparada con el control (figura 7B).

35

Ejemplos

Los ejemplos que siguen se incluyen para facilitar a los expertos en el área una descripción completa de cómo realizar y aplicar la presente invención. No debe considerarse de ningún modo que limitan el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni debe suponerse que constituyen una enumeración completa de todos los experimentos realizados.

Se van a presentar ejemplos que ilustran cada una de las etapas que comprende la fabricación de las prótesis con recubrimiento biológico objeto de esta invención. Consecuentemente debe entenderse que la fabricación de esta prótesis requiere de la realización secuencial de uno de los ejemplos propuestos para cada una de las etapas.

Ejemplo 1.1: Deposición de una lámina funcionalizada sobre la superficie de la prótesis mediante silanización por vapor activado con una única línea de flujo de vapor activado.

La siguiente Tabla muestra el rango de los parámetros preferidos del proceso de funcionalización por silanización por vapor activado compatible con la deposición de láminas funcionalizadas, en particular con un espesor de 20 nm a 300 nm sobre prótesis de aleación Ti6Al4V.

Parámetro	Valor o Rango de valores
Composición del organometálico	3-Aminopropiletoxisilano (APTES)
Gas portador	Argón
Temperatura de evaporación (°C)	130-200
Presión de trabajo del sistema durante la deposición (mbar)	0,5-2
Temperatura de activación del vapor (°C)	650-800
Angulo de incidencia del flujo de vapor activado en la superficie de la prótesis (°)	0 - 50
Distancia entre la salida del flujo de vapor activado y la superficie de la prótesis (cm)	2 - 6

Tiempo de deposición (min)	5-120
Área de la prótesis funcionalizada (cm ²)	1 - 4

En particular, se encuentra que con el siguiente conjunto de parámetros de proceso ($T_{\text{evaporación}}=150\text{ °C}$; $T_{\text{activación}}=750\text{ °C}$; $p=1\text{ mbar}$; $t_{\text{deposición}}=20\text{ min}$) se obtiene una lámina funcionalizada con un espesor de aproximadamente 100 nm. Alternativamente, el empleo de las mismas condiciones, pero empleando una presión de argón de $p=2\text{ mbar}$ conduce a la deposición de una lámina funcionalizada de 200 nm. En ambos casos se obtiene una densidad superficial de grupos amino en superficie estimada en 8 grupos $-\text{NH}_2$ por nm^2 , próximo al valor teórico de una monocapa de grupos amino sobre una superficie.

10 **Ejemplo 1.2: Unión covalente de biomoléculas o moléculas orgánicas a los grupos reactivos de lámina funcionalizada.**

1.2.1. Inmovilización de fibronectina

15 Debido a su abundancia natural en el organismo y a su función clave como componente de la matriz extracelular, la fibronectina es una de las moléculas más utilizadas con objeto de modular la respuesta del organismo al implante de prótesis. A continuación se presenta un procedimiento con el que es posible inmovilizar covalentemente fibronectina sobre una superficie de una prótesis previamente funcionalizada mediante SVA (en particular, cuando la funcionalización tiene lugar tal como se describe en el ejemplo 1.1 de este documento). Este procedimiento de inmovilización se basa en el uso de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y de N-hidroxisuccinimida (NHS) como agentes entrecruzantes. Como estos agentes entrecruzantes no se integran en la estructura formada por la lámina funcionalizada y la proteína, este sistema se considera de longitud nula. Un ejemplo del resultado de emplear el sistema EDC/NHS como agentes entrecruzantes para unir covalentemente una proteína a una superficie biofuncionalizada se representa en la Figura 3.

30 De forma más específica, para la inmovilización covalente de fibronectina sobre una superficie funcionalizada con una densidad superficial elevada de grupos $-\text{NH}_2$ se parte de una disolución de fibronectina con una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina en tampón 0,1 M de MES (ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico), incubándose la prótesis durante una hora en dicha solución. Posteriormente se añade una solución de EDC/NHS en tampón

MES de manera que la concentración final de ambos agentes entrecruzantes en la disolución sea de 0,125 mg/ml (EDC) y de 0,0315 mg/ml (NHS). La prótesis se incuba durante cuatro horas en esta solución, procediéndose finalmente a la limpieza (ver a continuación) para eliminar los posibles restos de EDC y NHS libres que no hayan participado en la reacción.

La limpieza de la muestra tuvo lugar tal como se indica a continuación. Inmediatamente después de retirar la solución de entrecruzantes, la muestra se lavó con agua destilada y, posteriormente, se realizaron dos procesos de incubación en tampón PBS (2 horas cada incubación). A continuación se llevó a cabo la incubación de la muestra tratada en tampón MES durante un periodo de 72 horas y, finalmente, se realizaron dos ciclos de incubación en DMEM (12 horas cada incubación).

1.2.2. Inmovilización de albúmina

En una segunda variante, el protocolo descrito en el apartado 1.2.1 puede modificarse para inmovilizar albúmina. Con este fin se parte de una disolución de 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, por su acrónimo en inglés) en tampón MES a una concentración de 0,1M incubándose con una prótesis previamente funcionalizada (en particular, siguiendo el procedimiento de deposición que se describe en el ejemplo 1.1 de este documento) durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se añade EDC/NHS como agentes entrecruzantes, de manera que las concentraciones finales de cada uno de los componentes sean: BSA-2,5 mg/ml, EDC-2,5 mg/ml, NHS- 0,63 mg/ml. Se mantiene la incubación de la prótesis durante 4 horas, lavándose con agua destilada para eliminar el exceso de BSA no unido covalentemente al material.

Ejemplo 1.3: Cultivo de células sobre la prótesis modificada por la presencia de la lámina funcional y de las moléculas inmovilizadas en dicha lámina en un medio de cultivo de proliferación

Las células madre multi-potentes de origen mesenquimal procedentes de médula ósea (BM- MSC) pueden obtenerse mediante biopsia de los huesos largos del donante que, en el caso de que su estado general lo permita, puede tratarse del receptor posterior de la prótesis con el recubrimiento biológico (autotransplante).

A partir de la biopsia es posible aislar y expandir las células MSC siguiendo el protocolo que se detalla a continuación. En primer lugar, el contenido celular obtenido tras la biopsia se filtra y se centrifuga, recuperándose el sedimento enriquecido en células. Las células así obtenidas se cultivan en medio completo para células mesenquimales humanas denominado MesenCult, conteniendo medio basal suplementado con factores específicos para células humanas (Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplements and MesenCult® MSC Basal Medium, Stem Cell Technologies Human; Catalog #05402 y Catalog #05401), así como 100 U/mL penicilina and 100 µg/mL estreptomina. Una vez realizados al menos cinco pases de cultivo, con el consiguiente enriquecimiento en células mesenquimales, los pases siguientes se realizan en medio MesenCult suplementado 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina. Para su empleo en las prótesis con recubrimiento biológico se prefiere el uso de células con un número de pases entre 5 y 15.

Las células BM-MSK se pueden cultivar sobre la prótesis previamente esterilizada. La esterilización de la prótesis se realiza por exposición a radiación ultravioleta de manera que toda la superficie de la misma quede expuesta durante un mínimo de 20 minutos a la radiación. Las células se depositan a una concentración de $2,5 \times 10^4$ células por cm^2 de prótesis, manteniéndose el cultivo en el mismo medio utilizado entre los pases 5 y 15, esto es medio MesenCult suplementado 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina.

La Figura 4 ilustra el resultado de las tres etapas de las que consta el procedimiento siguiendo el ejemplo descrito. En la Figura 5 se compara la supervivencia y crecimiento celular de muestras BM-MSK sobre una muestra control de Ti6Al4V (Figura 5A) con una muestra funcionalizada mediante SVA a la que se ha unido covalentemente fibronectina. En la Figura 6 se muestra la mejora en la adhesión de las células BM-MSK sobre la superficie del Ti6Al4V funcionalizado con fibronectina (figura 6F) comparada con el material sin funcionalizar (figura 6D). En este caso, ambas muestras se han sometido a una incubación con tripsina durante 1 minuto. No se observan células sobre la superficie del material no funcionalizado después del tratamiento, en contraste con la presencia de un grupo numeroso de células en el material funcionalizado.

Ejemplo 1.4: Diferenciación de células sobre la prótesis modificada por la presencia de la lámina funcional y de las moléculas inmovilizadas en dicha lámina en medio de cultivo de diferenciación

35

La diferenciación de las células BM-MSc a condrocitos se ha conseguido utilizando un medio de cultivo con la siguiente composición: DMEM con elevada glucosa (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 1X de medio basal insulina-transferrina-selenio (Gibco, con una concentración final de 10mg/l de insulina bovina, 5,5 mg/l de transferrina, 5 µg/l de selenio sódico, 4,7 µg/l de ácido linoleico y 9,5 mg/ml de albúmina de suero bovino), 1 mM de piruvato sódico, 0,1 µM dexametasona, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 10 ng/ml del factor de crecimiento transformante (TGF-Beta1, Preprotech), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina y 2 mM de L-glutamina. La diferenciación se ha analizado a los 10 días de cultivo en medio de diferenciación, mediante el uso de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-agrecano, por ser este un polisacárido característico de condrocitos. En la Figura 7 se observa cómo las células BM-MSc diferenciadas en el sustrato de Ti6Al4V funcionalizado con fibronectina (figura 7D) presentan una secreción de agrecano muy superior a las células crecidas sobre el control (figura 7B).

15

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para obtener una prótesis con un recubrimiento, caracterizado porque el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 5 a) depositar una lámina funcionalizada con grupos reactivos seleccionados del grupo que consiste en amino (-NH₂), carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), sulfhidrilo (-SH) y una combinación de los anteriores, haciendo incidir flujos de vapor activado independientes en diferentes zonas de la superficie de una prótesis y siendo la superficie donde se deposita la lámina mayor a 1 cm²;
- 10 b) inmovilizar al menos una molécula orgánica en la lámina depositada en la etapa a) para obtener un primer recubrimiento; y
- c) cultivar *in vitro* al menos un tipo de células sobre el primer recubrimiento obtenido en la etapa b), dando lugar a un segundo recubrimiento sobre al menos parte de la superficie de la prótesis.

15

2.- El procedimiento para obtener una prótesis según la reivindicación 1, donde la etapa c) comprende adicionalmente la diferenciación de las células cultivadas a linajes compatibles con el tejido huésped.

20

3.- El procedimiento para obtener una prótesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la prótesis está formada por un material seleccionado del grupo que consiste en metálico, cerámico y polimérico.

25

4.- El procedimiento para obtener una prótesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la etapa a) comprende las siguientes sub-etapas:

- ai) evaporar un compuesto organometálico que contiene al menos un átomo de silicio y al menos un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en amino (-NH₂), carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), sulfhidrilo (-SH) y una combinación de los anteriores;
- 30 aii) obtener flujos de vapor activado mediante calentamiento del vapor de compuesto organometálico de la etapa ai) a una temperatura entre 400 y 1000 °C;
- aiii) hacer incidir flujos de vapor activado independientes obtenidos en la etapa aii) en diferentes zonas de la superficie de una prótesis con una extensión mayor a 1 cm², donde el

ángulo de incidencia de los flujos de vapor activado respecto a la superficie de la prótesis a funcionalizar es de 0° a 50°;

donde las etapas aii) y aiii) tienen lugar de forma consecutiva.

- 5 5.- El procedimiento para obtener una prótesis según la reivindicación 4, donde la etapa aiii) tiene lugar en una cámara de deposición (7) conectada a más de una región de activación (6a, 6b, 6c), cada una de estas regiones con una salida de flujo de vapor activado (10a, 10b, 10c) situada a una distancia entre 2 cm y 6 cm de la superficie de la prótesis a funcionalizar.
- 10 6.- El procedimiento para obtener una prótesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la etapa b) comprende inmovilizar una molécula orgánica seleccionada del grupo que consiste en biomolécula, compuesto activo farmacéutico y una combinación de los anteriores.
- 15 7.- El procedimiento para obtener una prótesis según la reivindicación 6, donde
- la biomolécula se selecciona del grupo que consiste en proteínas de la matriz extracelular, albúmina, moléculas de señalización celular, un fragmento de cualquiera de estas biomoléculas y una combinación de las anteriores; o
 - el compuesto activo farmacéutico es un antibiótico.
- 20 8.- El procedimiento para obtener una prótesis según la reivindicación 7, donde la proteína de matriz extracelular es fibronectina o fragmentos de dicha proteína.
- 25 9.- El procedimiento para obtener una prótesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la etapa b) tiene lugar en presencia de al menos un agente de entrecruzamiento.
- 30 10.- El procedimiento para obtener una prótesis según la reivindicación 9, donde la molécula orgánica es una biomolécula, y el agente de entrecruzamiento es una combinación formada por EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y NHS (N-hidroxisuccinimida).
- 11.- El procedimiento para obtener una prótesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la etapa c) comprende cultivar células pluri- o multi-potentes.

12.- Una prótesis recubierta, caracterizada porque el recubrimiento comprende un primer recubrimiento con células adheridas a este recubrimiento, donde esta prótesis recubierta se obtiene por el procedimiento que se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 11.

13.- La prótesis recubierta según la reivindicación 12, que comprende:

- una prótesis con al menos una superficie de un material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en metálico, cerámico y polimérico;

10 - un primer recubrimiento que comprende:

o una lámina funcionalizada con grupos reactivos seleccionados del grupo que consiste en amino (-NH₂), carboxilo (-COOH), hidroxilo (-OH), sulfhidrilo (-SH) y una combinación de los anteriores, depositada en diferentes zonas de la superficie de la prótesis con una extensión mayor a 1cm²; y

15 o al menos una molécula orgánica inmovilizada en la lámina funcionalizada; y

- un segundo recubrimiento que comprende células pluri-potentes o multi-potentes adheridas al primer recubrimiento.

14.- La prótesis según la reivindicación 13, donde la molécula orgánica inmovilizada es 20 fibronectina.

15.- La prótesis según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde las células adheridas al primer recubrimiento son células mesenquimales BM-MSK con capacidad de diferenciarse a osteoblastos o condrocitos.

25

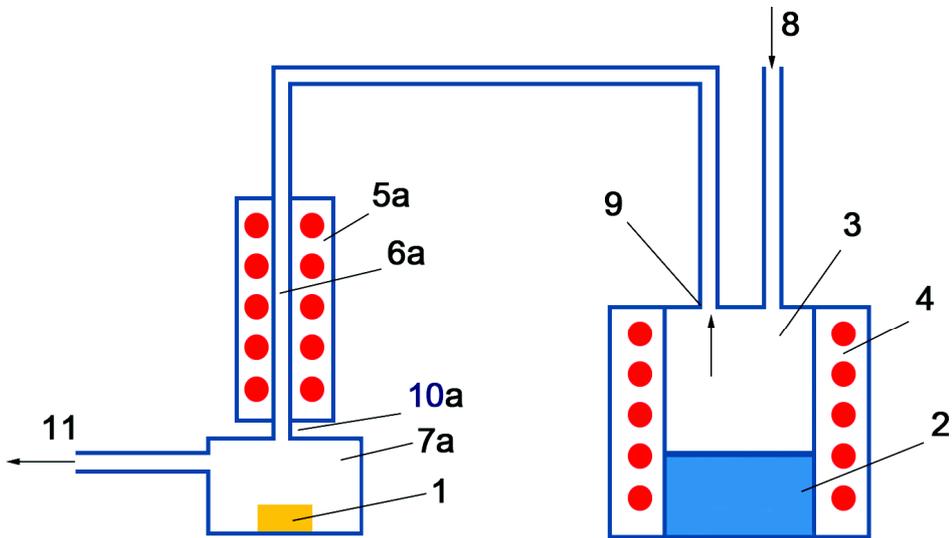


FIG.1a

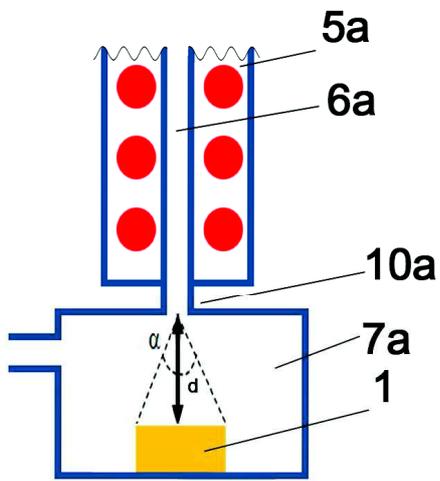


FIG.1b

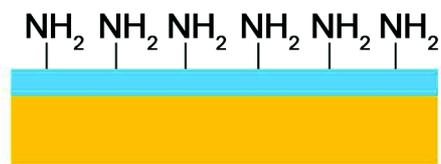
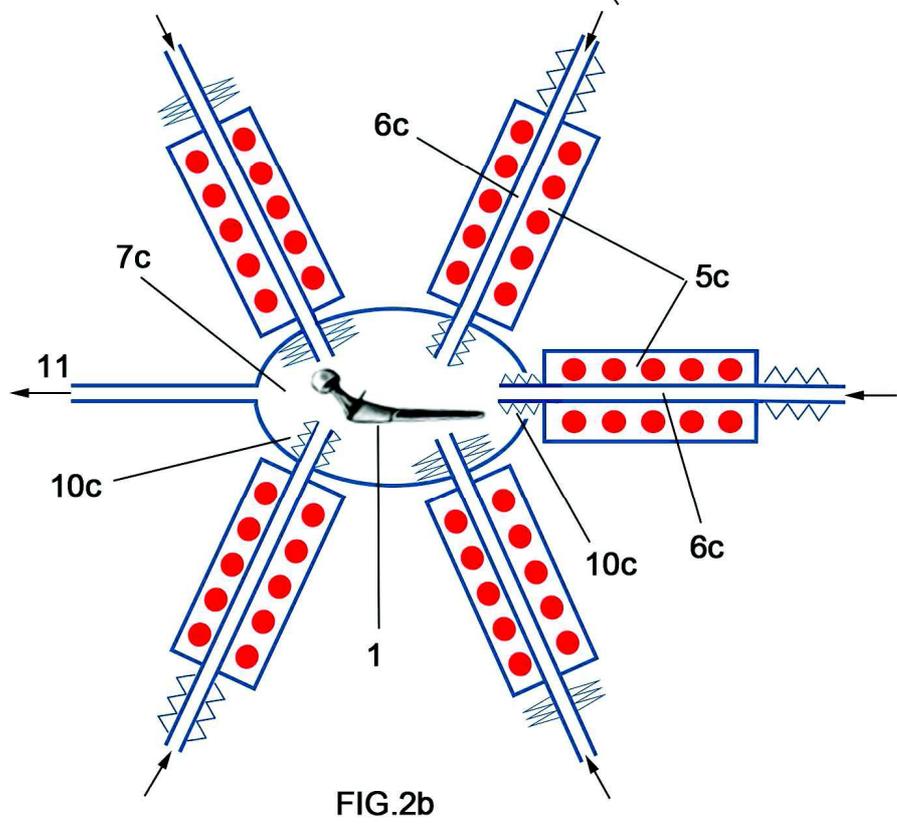
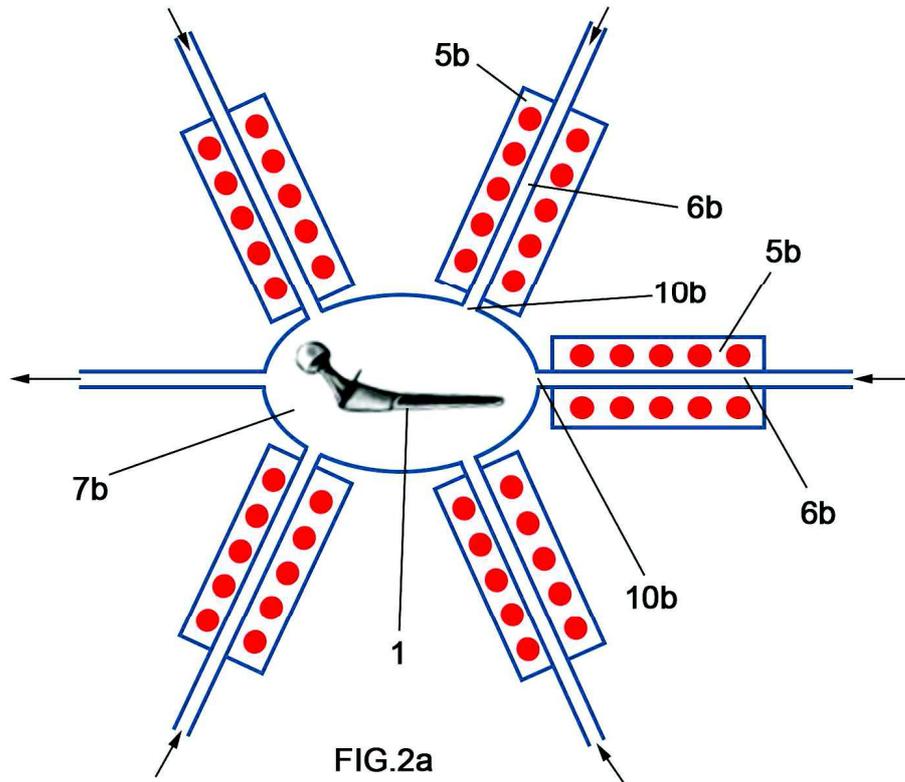


FIG.1c



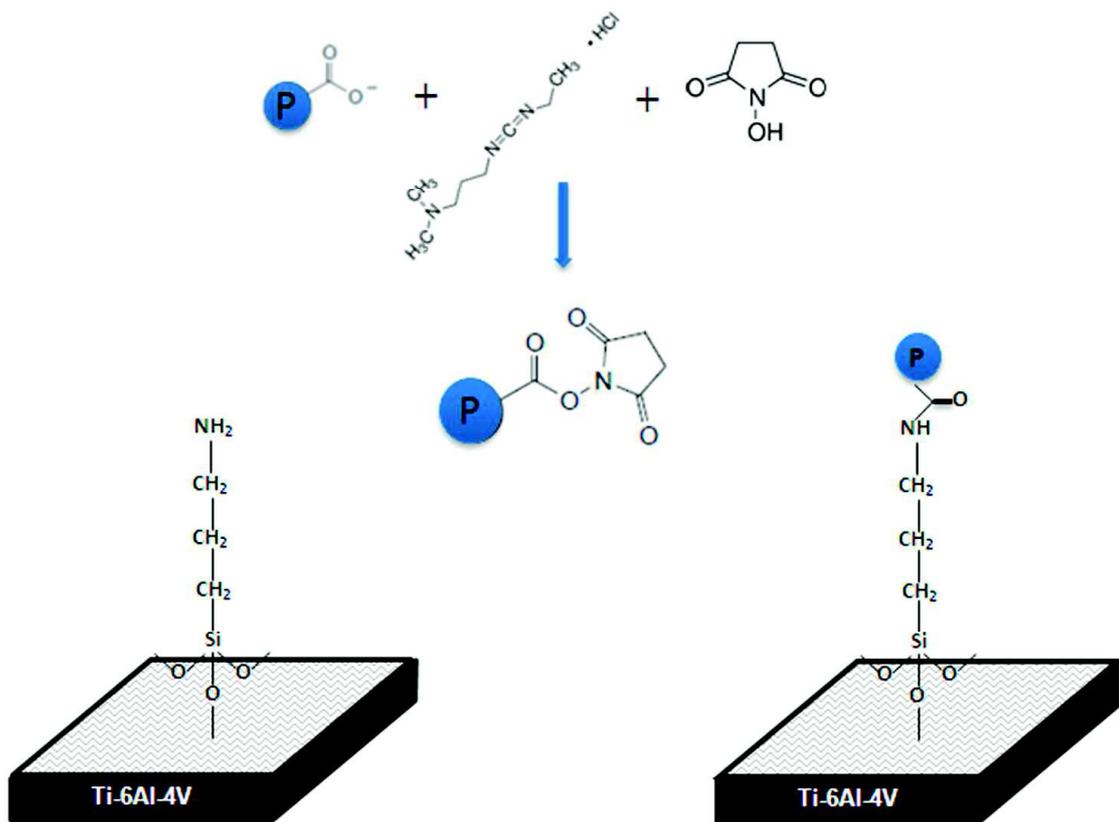


Fig.3

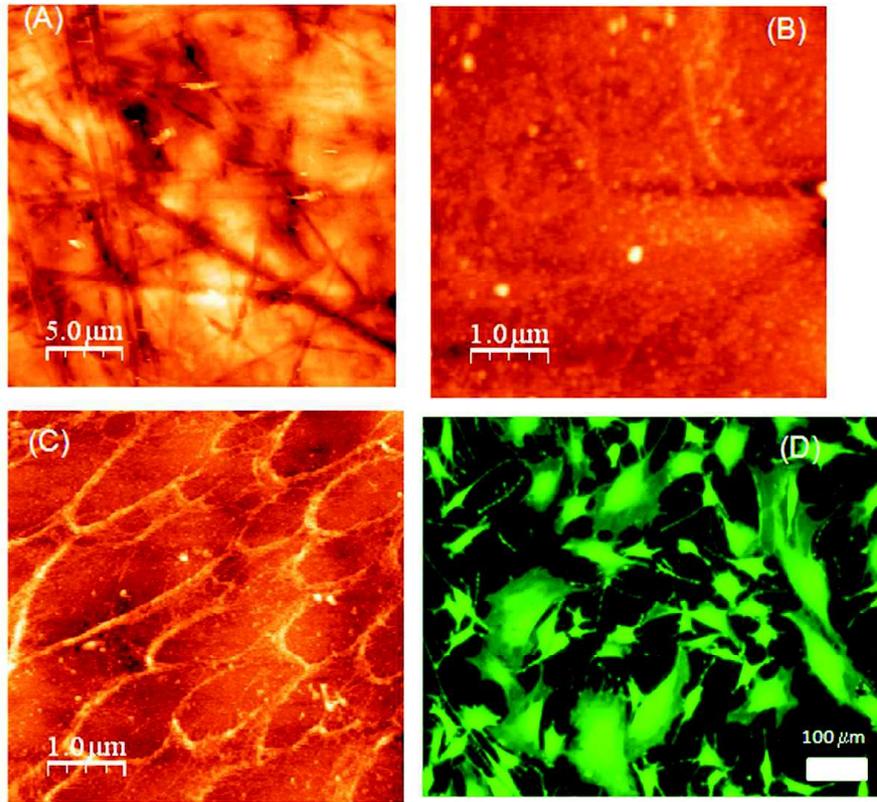


Fig.4

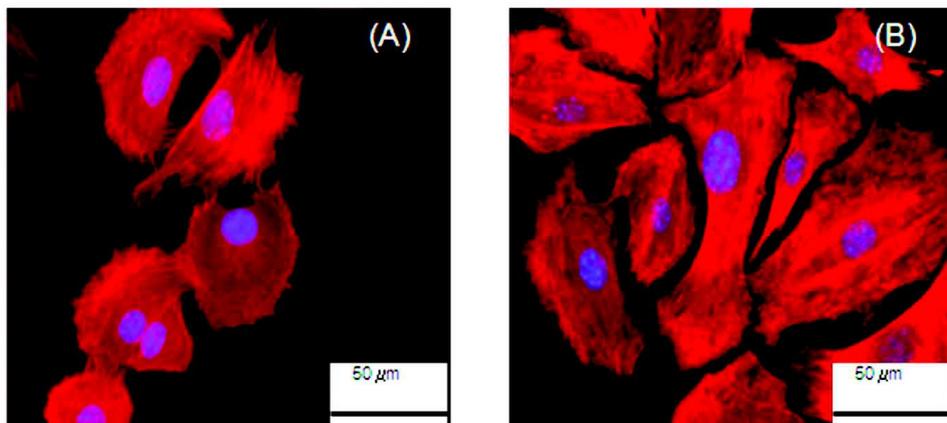


Fig.5

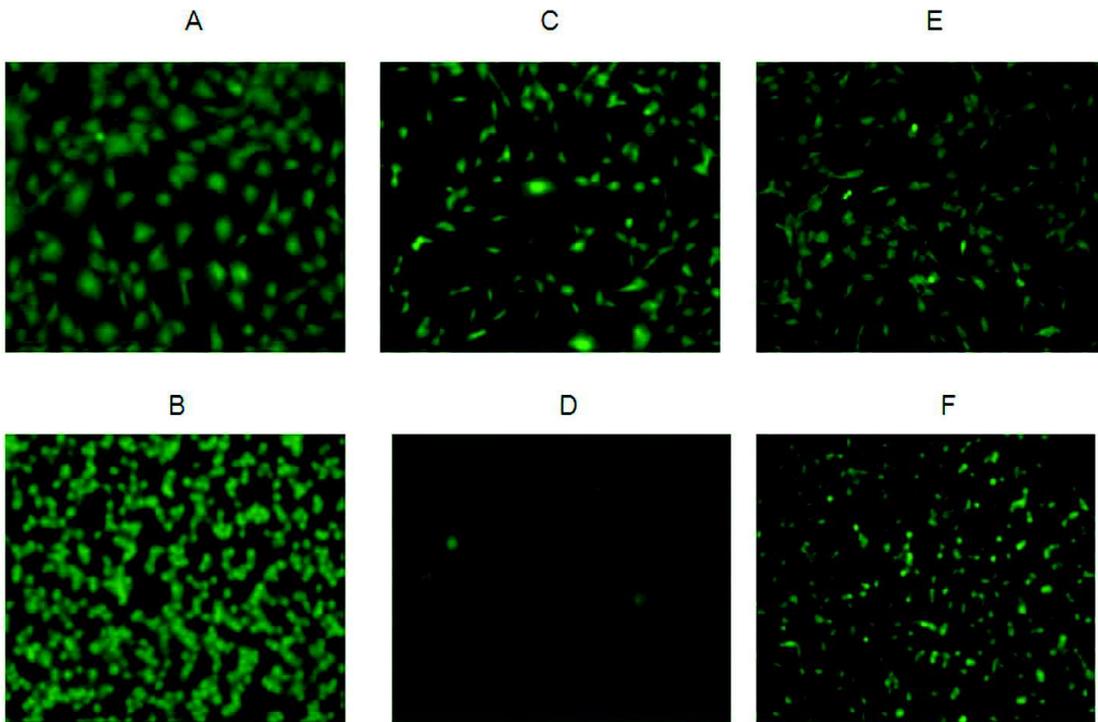


Fig.6

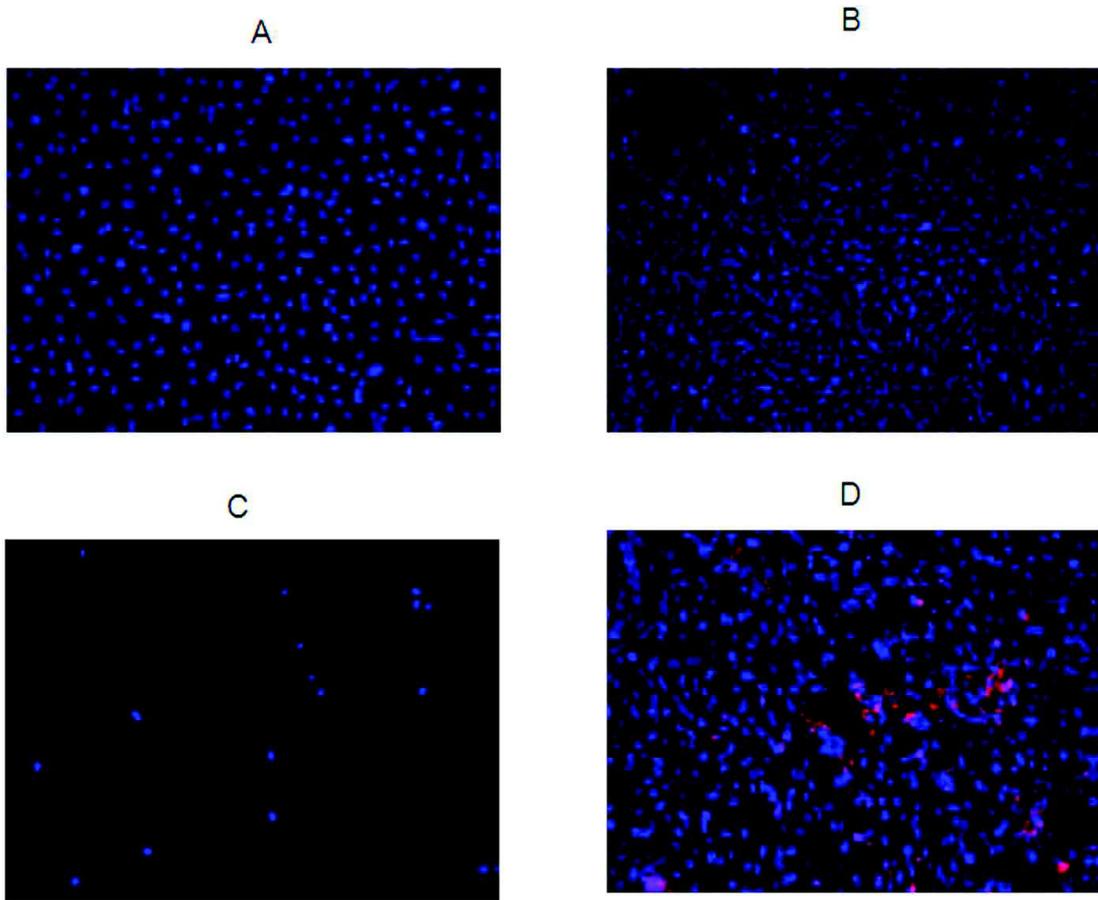


Fig.7