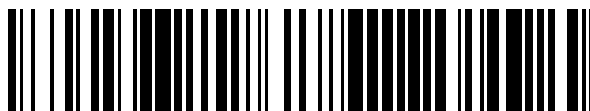


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 117**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61L 29/08 (2006.01)
A61L 29/14 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2011** **E 16200770 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019** **EP 3162386**

54 Título: **Dispositivos médicos implantables**

30 Prioridad:

13.12.2010 US 422491 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.06.2020

73 Titular/es:

THERADEP TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
220 S. California Ave., Suite 250
Palo Alto, CA 94306, US

72 Inventor/es:

O'NEILL, LIAM;
O'DONOGHUE, JOHN;
O'KEEFFE, JOE y
DOBBYN, PETER

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 764 117 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Dispositivos médicos implantables

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para depositar una biomolécula sobre un sustrato utilizando plasma, tal como una descarga no térmica a presión atmosférica.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] En general hay dos tipos de plasma, en concreto, los plasmas equilibrio térmico y de equilibrio no isotérmico. Los plasmas de equilibrio térmico normalmente son calientes con temperaturas ~10.000 K y se utilizan en la industria como antorchas de plasma, chorros y arcos para la soldadura. Estos sistemas de plasma caliente también se usan en el recubrimiento por pulverización térmica donde pueden usarse para depositar recubrimientos metálicos y cerámicos sobre superficies metálicas para aplicaciones tan diversas como producir recubrimientos biocompatibles de hidroxiapatita en implantes médicos para depositar recubrimientos protectores en componentes de turbina de gas. A pesar del uso generalizado de plasmas térmicos para producir recubrimientos cerámicos de hidroxiapatita biocompatibles, sus aplicaciones están limitadas por la alta energía térmica dentro de estos dispositivos que impiden que estos dispositivos depositen materiales sensibles a la temperatura tales como proteínas, polisacáridos y otros biomateriales.

[0003] Por el contrario, los plasmas no isotérmicos generalmente son fríos y pueden emplearse en procesos de fabricación que incluyen limpieza superficial (eliminación de contaminantes no deseados), ataque químico (eliminación del material de sustrato en masa), activación (cambio de energías superficiales) y deposición de recubrimientos de película fina funcionales sobre superficies. Históricamente, estos dispositivos de recubrimiento estaban limitados a condiciones de vacío y solo utilizaban precursores de fase gaseosa para producir recubrimientos. Sin embargo, los sistemas de plasma han sido ampliamente utilizados para modificar las superficies para permitir la subsiguiente fijación de biomoléculas a través de técnicas químicas húmedas tradicionales, y esta área ha sido ampliamente revisada por Siow et al. (Plasma Processes and Polymers, 2006, 3, páginas 392-418).

[0004] En los últimos años se ha observado el desarrollo de dispositivos de plasma que funcionan a presión atmosférica y que también pueden producir recubrimientos funcionales usando monómeros en fase gaseosa, y un ejemplo típico se observa en Allcock et al., Langmuir, 2007, 23, 8103-8107. Sin embargo, el cambio de los sistemas de vacío a presión ambiente también permite el uso de precursores distintos de los monómeros en fase gaseosa en la producción de películas delgadas. La patente de Estados Unidos n.º 4.929.319 describe un proceso para tratar un sustrato plástico en el que se introduce un aerosol líquido en una descarga corona atmosférica mientras se pasa un sustrato plástico plano a través de la descarga corona.

[0005] La patente de Estados Unidos n.º 7.455.892 describe un procedimiento para producir un recubrimiento en el que un material formador de polímero es atomizado en una descarga luminiscente de plasma homogénea a presión atmosférica con el fin de producir un recubrimiento polimérico sobre un sustrato. La lista de monómeros potenciales descritos incluye numerosos materiales que son bien conocidos para polimerizar bajo exposición a radicales libres o radiación UV para producir un recubrimiento. Estos precursores normalmente contienen grupos vinílicos, cíclicos u otros grupos reactivos.

[0006] El documento WO 2007/106212 describe un sistema de plasma que combina una activación de plasma a presión atmosférica acoplada a una cámara de deposición al vacío con el fin de depositar una biomolécula sobre una superficie. La idea de combinar cámaras de vacío y chorros de plasma a presión atmosférica en un sistema representa un reto complejo de ingeniería.

[0007] En los sistemas de polimerización de plasma tradicionales, es práctica habitual el uso de monómeros que contienen grupos reactivos que experimentan reacciones de polimerización de radicales libres o iónicos y la presencia de estos grupos permite que los monómeros produzcan recubrimientos polimerizados secos sin el uso de plasmas de alta energía. Se ha podido polimerizar con plasma materiales tales como alcanos que no poseen grupos reactivos. Sin embargo, esto requiere que el plasma tenga energía suficiente para romper los enlaces químicos dentro de los monómeros y esto da lugar a una fragmentación y reordenación significativas de las moléculas precursoras resumidas por Heyse et al. (Plasma Processes and Polymers, 2007, 4, pg 145 - 157). Puesto que las biomoléculas, tales como el colágeno, no poseen los grupos reactivos (por ejemplo, vinilo) que se espera que

participen en una polimerización inducida por plasma de baja energía, es lógico concluir que para producir un recubrimiento a partir de dicho material sería necesario inducir la rotura de los enlaces dentro de la molécula. Esto induciría un daño significativo a la biomolécula y cabría esperar que la molécula resultara biológicamente inactiva. Por lo tanto, el desarrollo se ha enfocado en maneras de unir indirectamente moléculas a una superficie recubierta de plasma.

[0008] Un procedimiento común era depositar primero un recubrimiento de plasma y luego unir las biomoléculas en una etapa separada mediante técnicas químicas húmedas. Sin embargo, esto resulta en un proceso de múltiples etapas con altos costes y por lo tanto existe un requisito para un enfoque más rápido y de un solo paso usando tecnología de plasma. Como alternativa, se han utilizado sistemas de plasma para depositar recubrimientos sobre los que subsiguientemente se pueden unir biomoléculas en otro proceso de varios pasos. Esta área ha sido cuidadosamente revisada por Kim Shyong Siow et al. en Plasma Processes and Polymers, 2006, volumen 3, páginas 392-418.

[0009] Dado que la mayoría de las biomoléculas no poseen grupos vinilo u otras funcionalidades químicas que se esperaría que experimentasen reacciones de polimerización de tipo radicales libres, se creía previamente que para formar un recubrimiento de plasma que contuviese tales moléculas era necesario atrapar físicamente estas moléculas dentro de una película polimérica formada a partir de monómeros reactivos con plasma tradicionales que contienen grupos vinilo o química equivalentes. Por lo tanto, la biomolécula se mezclaba con el monómero reactivo dentro del plasma y a medida que el monómero reactivo se sometía a reacciones de formación de película, esto permitía que la biomolécula quedara físicamente atrapada dentro del recubrimiento en crecimiento, como se describe en los documentos WO2005/110626 y WO2005/106477. La desventaja de este proceso es que el recubrimiento contendría cantidades significativas de polímeros químicos que no son biocompatibles y pueden inducir respuestas inflamatorias en un entorno biológico.

[0010] El documento WO 2005/110626 describe el uso de un dispositivo de plasma no térmico para convertir un aerosol líquido que contiene un agente activo y un monómero reactivo en un recubrimiento seco que contiene tanto un polímero (producido por polimerización del monómero reactivo) como un agente activo que está atrapado físicamente en el recubrimiento polimérico. La patente se refiere específicamente al recubrimiento de implantes médicos y se refiere a la incorporación de un biopolímero (colágeno) como agente activo. De forma similar, el documento WO 2005/106477 describe un proceso de plasma no térmico a presión atmosférica para depositar recubrimientos que contienen biomoléculas. El proceso implica la introducción de monómeros reactivos y biomoléculas (proteínas, azúcares, sustancias fisiológicamente activas, materiales biomiméticos) en el plasma para producir un recubrimiento polimerizado del monómero reactivo que atrapa el agente activo sobre una superficie mediante la incorporación de la biomolécula en una matriz de polímero.

[0011] El documento WO 2010/105829 describe una tecnología para la deposición de biomoléculas usando plasma en la que las biomoléculas se introducen como vapor en el plasma. La patente describe el concepto de pulverizar una solución en una cámara, evaporando el disolvente y después polimerizando en plasma la biomolécula evaporada para formar un recubrimiento sobre una superficie. La descripción de la patente menciona el uso de moléculas bioactivas (proteínas, polisacáridos, etc.) sobre diversas superficies, incluyendo dispositivos implantables.

[0012] La coagulación con plasma de argón (CPA) también es una técnica bien conocida utilizada en medicina y el documento US 2007/0225700 describe aplicaciones típicas de esta técnica. Los sistemas de CPA utilizan un plasma de argón para alterar el tejido mediante una combinación de coagulación de proteínas y deshidratación de tejidos. Sin embargo, no se tiene cuidado de controlar qué proteínas están presentes en la región de coagulación y la técnica nunca se ha aplicado a un implante médico.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0013] La presente invención es un procedimiento como se define en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas. Los detalles de ciertas realizaciones se establecen en las reivindicaciones dependientes.

[0014] Una realización descrita en la presente memoria está dirigida a superar la fragmentación del precursor inducida por dispositivos de plasma tradicionales y al uso de estos dispositivos de plasma tradicionales para depositar directamente recubrimientos funcionales a partir de biomoléculas de alto peso molecular.

[0015] En el presente documento se describe el uso de dispositivos de plasma para la deposición de biomoléculas o células vivas sobre una superficie de un sustrato, tales como sustratos metálicos conductores,

superando problemas previos con el tratamiento de sustratos metálicos conductores debido a la formación de arcos de alta energía.

[0016] En el presente documento se describe el uso de dispositivos de plasma para la deposición de biomoléculas o células vivas y/o biopolímeros prepolimerizados que no sufren polimerización cuando se exponen a sistemas de polimerización tradicionales tales como radicales libres o luz UV. Como estas moléculas ya tienen pesos moleculares grandes, incluso un ligero grado de coagulación da como resultado un recubrimiento sólido.

[0017] Otra realización proporciona un procedimiento para depositar solo una biomolécula en ausencia de un monómero reactivo.

[0018] Otra realización describe el uso de dispositivos de plasma para deposición de biomoléculas, superando problemas de la técnica anterior tales como cuando la deposición está limitada a sistemas en fase gaseosa y requiere el calentamiento de la solución precursora, que es probable que desnaturalice muchas biomoléculas.

[0019] También se describen en el presente documento técnicas de modificación de superficie que permiten una deposición de una sola etapa de biomoléculas y/o células vivas sobre una superficie sin el uso de sistemas de vacío o monómeros reactivos adicionales. Al introducir soluciones que comprenden biomoléculas en un plasma no térmico a presión atmosférica, es posible crear una unión directa de las biomoléculas a la superficie del implante. Esto no implica la polimerización de la biomolécula, por ejemplo, un biopolímero, sino que en su lugar implica cierta reticulación de las hebras de biopolímero con formación adicional de enlaces a la superficie del sustrato activado. En efecto, el plasma se puede usar para iniciar la coagulación de los materiales biológicos para formar un recubrimiento.

[0020] Adicionalmente, es posible conseguir la deposición de células vivas sobre una superficie de implante con o sin la presencia de biomoléculas adicionales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0021]

La Figura 1 es un gráfico de barras que ilustra los datos del ejemplo 1.

La Figura 2 es un gráfico lineal que ilustra los datos del ejemplo 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0022] El proceso descrito en el presente documento implica disolver al menos una biomolécula para formar una solución; nebulizar la solución, por ejemplo con un gas, para formar un aerosol líquido; combinar el aerosol líquido y un plasma para formar un recubrimiento; y depositar, en ausencia de monómeros reactivos, el recubrimiento sobre una superficie de sustrato. Esto da lugar a que las biomoléculas nebulizadas se activen dentro del plasma y formen un recubrimiento seco coagulado sobre la superficie. Inesperadamente, se ha encontrado que este proceso no desactiva las biomoléculas y se puede retener un alto grado de bioactividad en el recubrimiento resultante.

[0023] La al menos una biomolécula para su uso en el proceso descrito puede ser un biopolímero reabsorbible, un biopolímero derivado naturalmente, una proteína y/o un polisacárido. En un aspecto, la al menos una biomolécula es colágeno. El biopolímero reabsorbible puede incluir, pero no está limitado a, quitosano, fibrinógeno, ácido hialurónico, fibronectina y fosforilcolina. Los biopolímeros derivados naturalmente incluyen, pero no se limitan a, quitosano, quitina, hialuronano, almidón, polihidroxialcanoatos y celulosa bacteriana. Las proteínas, para su uso en el presente documento como biomolécula, incluyen, pero no se limitan a, colágeno, fibrina, fibrinógeno, proteína morfogenética ósea (BMP), gelatina, fibronectina, fibrulina, integrina e insulina. Los polisacáridos incluyen, pero no se limitan a, α -glicosaminoglicanos, alginato, celulosa, quitina, quitosano, ácido hialurónico y heparina. En un aspecto, la al menos una biomolécula es una proteína implicada en la coagulación de la sangre.

[0024] El recubrimiento también puede estar formado por otras biomoléculas tales como polipéptidos, poliglicanos, hormonas, lípidos, interferones, cartílagos, agentes biológicos terapéuticos derivados tanto celulares como sintéticos, agentes biológicos autólogos, homólogos y alógrafos y xenográficos, y células sanguíneas

derivadas sintéticas y recombinantes, autólogas u homólogas, biomoléculas que contienen agentes antimicrobianos/antibióticos o agentes bacteriostáticos, células pluripotenciales, células estromales, colágeno dérmico humano derivado de fibroblastos, proteínas de matriz, factores de crecimiento y citoquinas, células que se encuentran en tejido conectivo suelto tales como células endoteliales, células que se encuentran en tejido adiposo, macrófagos/monocitos, adipocitos, pericitos, células reticulares que se encuentran en el estroma de la médula ósea y queratinocitos autólogos cultivados. El recubrimiento puede contener mezclas de biomoléculas. En un aspecto, la biomolécula es una célula viva seleccionada del grupo que consiste en células pluripotenciales, células progenitoras y células autólogas.

- 10 **[0025]** La cantidad de biomolécula presente en el recubrimiento aplicado al sustrato puede variar dependiendo de numerosas variables incluyendo, pero sin limitarse al sustrato, y la biomolécula utilizada. En un aspecto, la cantidad de biomolécula presente en el recubrimiento puede ser suficiente para cubrir completamente la superficie del implante y minimizar las interacciones entre el implante y el sistema inmune del paciente. En aplicaciones ortopédicas, la cantidad de biomoléculas puede estar presente en cantidades suficientes para promover y mejorar la fijación ósea. En aplicaciones de tejidos blandos, la cantidad de biomolécula presente puede ser suficiente para promover la integración y fijación del implante en el tejido blando.

- 20 **[0026]** La biomolécula puede disolverse en cualquier disolvente conocido, incluyendo pero no limitado a pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, benceno, tolueno, 1,4-dioxano, cloroformo, éter dietílico, diclorometano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, acetona, dimetilformamida, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, ácido fórmico, n-butanol, isopropanol, n-propanol, etanol, metanol, ácido acético y agua. El disolvente no debe afectar a la bioactividad de la biomolécula.

- 25 **[0027]** Se puede utilizar cualquier procedimiento adecuado para nebulizar la solución que contiene la solución de la biomolécula. Esto puede incluir sistemas de pulverización por ultrasonidos, boquillas rotatorias, dispositivos de electronebulización, boquillas hidráulicas, pulverización neumática o sistemas de aspersión asistida por gas. Para sistemas asistidos por gas, se puede usar cualquier gas adecuado para nebulizar la solución que comprende la biomolécula. Por ejemplo, el gas se puede seleccionar del grupo que consiste en gas nitrógeno, gas helio, gas argón y mezclas de los mismos.

- 30 **[0028]** El recubrimiento puede formarse sin la adición de material formador de película tradicional. No hay ningún requisito para añadir materiales precursores que experimenten polimerización de radicales libres o ionizada convencional inducida por plasma a través de grupos reactivos tales como estructuras de anillo cíclico no saturados (dobles o triples enlaces), anillos aromáticos, peróxidos, silanos, epóxidos u otros grupos reactivos. En un aspecto, el procedimiento comprende depositar, en ausencia de monómeros reactivos, el aerosol que comprende al menos una biomolécula sobre una superficie de sustrato. Por "monómeros reactivos" se entiende que incluye, por ejemplo, grupos vinilo, anillos cíclicos u otras funcionalidades químicas que se espera que experimenten reacciones de polimerización de tipo radicales libres.

- 40 **[0029]** El procedimiento para producir un sustrato recubierto también puede realizarse en ausencia de una etapa de calentamiento de cualquiera de la biomolécula, solución, aerosol, etc. La ausencia de una etapa de calentamiento asegura que la biomolécula no se desnaturalice. En un aspecto adicional, el procedimiento para producir una superficie recubierta también se puede realizar en ausencia de un sistema de vacío.

- 45 **[0030]** La introducción directamente de la biomolécula, como pulverización acuosa en un plasma a presión atmosférica de baja energía, se ha comprobado que produce una ruta de un paso para la formación de recubrimientos estables, secos y adherentes que retienen la actividad biológica de la biomolécula de partida.

- 50 **[0031]** El sustrato para su uso en el proceso descrito puede ser un dispositivo médico, tal como un dispositivo médico implantable. El dispositivo médico se puede seleccionar del grupo que consiste en un implante ortopédico, dental, espinal, craneal maxilofacial y un implante de fijación de traumatismo óseo. En un aspecto, el dispositivo médico se selecciona del grupo que consiste en un stent, un generador de impulsos implantable, una bomba implantable, una válvula, un dispositivo intervascular, un implante subdérmico, un implante transdérmico, un implante de retina, un implante coclear, un cable o catéter renal, un cable o catéter utilizado después de un traumatismo, un cable o catéter de andamio, un cable o catéter sensor y un cable o catéter eléctrico.

[0032] En el procedimiento descrito, el recubrimiento puede comprender ingredientes opcionales adicionales, tales como agentes activos biológicos y agentes farmacéuticos. Ejemplos de agentes activos biológicos incluyen, pero no se limitan a, vacunas, material genético, proteínas terapéuticas recombinantes, enzimas, aminoácidos,

esteroides, citoquinas, factores de crecimiento, vitaminas y hormonas. Ejemplos de agentes farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, anticoagulantes, antihistamínicos y antiinflamatorios. En un aspecto, el recubrimiento puede comprender mezclas de al menos una biomolécula, al menos un agente activo biológico y al menos un agente farmacéutico. En un aspecto adicional, la al menos una biomolécula es diferente del al menos un agente activo biológico.

[0033] Se describe la unión de células vivas a una superficie de sustrato, que comprende introducir un aerosol líquido que comprende una solución de células vivas en un plasma no térmico para formar células vivas tratadas con plasma; y depositar las células vivas tratadas con plasma sobre la superficie del sustrato. Como se ha descrito anteriormente con respecto a la al menos una biomolécula, las células vivas para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células pluripotenciales; células estromales; colágeno dérmico humano derivado de fibroblastos; proteínas de la matriz; factores de crecimiento y citoquinas; células que se encuentran en tejido conectivo suelto, tales como células endoteliales; células que se encuentran en el tejido adiposo; macrófagos/monocitos; adipocitos; pericitos; células reticulares que se encuentran en el estroma de la médula ósea; queratinocitos autólogos cultivados; y sus mezclas.

[0034] La solución de células vivas también puede comprender una biomolécula, tal como un biopolímero reabsorbible, un biopolímero derivado naturalmente, una proteína, un polisacárido, un agente biológico activo, un agente activo farmacéutico y mezclas de los mismos.

[0035] Las células vivas, por ejemplo, material autólogo, se pueden usar para mejorar la biocompatibilidad del sustrato y/o para reducir el rechazo del implante cuando el sustrato es un dispositivo médico implantable. El material autólogo puede ser sangre, plasma rico en plaquetas, fluido extracelular u otras células vivas, como se ha descrito anteriormente. El material autólogo puede tomarse del paciente y cultivarse mediante técnicas de cultivo celular convencionales para formar volúmenes suficientes para su uso en los procesos descritos.

[0036] Las formas de realización de la presente invención emplean dispositivos de plasma no térmicos en los que el plasma actúa próximo a temperatura ambiente, permitiendo así el procesamiento de materiales sensibles a la temperatura, sin imponer una carga térmica perjudicial sobre el material. La temperatura del plasma global preferentemente está por debajo de unos 40 grados Celsius. Pueden ser aceptables temperaturas de plasma de hasta aproximadamente 90°C para tiempos de exposición cortos de menos de aproximadamente 60 segundos. Incluso en sistemas de plasma de baja energía, los electrones calientes del plasma crean, mediante colisiones de alta energía, una fuente rica de radicales y especies excitadas con una alta energía potencial química capaz de reactividad química y física. Los plasmas de equilibrio no térmico se pueden crear a presión ambiente y han sido revisados extensamente por Roth (Roth J.R., Industrial Plasma Engineering, Volumen 2 Applications to Non-thermal Plasma Processing, Institute of Physics Publishing, 2001, páginas 37-73). Dichos plasmas incluyen descargas de barrera dieléctrica. Otro plasma de equilibrio no térmico es la descarga luminiscente a presión atmosférica (APGD) como se describe por Okazaki y col. (J. Phys. D: Appl. Phys., 26, 889 - 892 (1993)). Estos plasmas de APGD han sido descritos extensamente por Roth como Plasmas de descarga de brillo uniforme de una atmósfera (OUAGDP) y se ha comprobado que funcionan de 0,5 a 40 kHz. Los dispositivos de plasma corona también pueden funcionar en modo de equilibrio no térmico. Varios chorros de plasma también pueden operar en un modo de equilibrio "frío" o no térmico. En un aspecto, el plasma es un plasma de equilibrio no térmico a presión atmosférica de baja energía. En un aspecto adicional, el plasma es pulsado.

[0037] Para un control óptimo, el plasma se opera por debajo de 500 kHz y preferentemente por debajo de 60 kHz y se puede pulsar de modo controlado para reducir al mínimo la energía suministrada al aerosol y al sustrato. Esto permite reacciones plasmáticas controladas que preservan la funcionalidad del precursor y no dañan o fragmentan especies activas sensibles.

[0038] Como alternativa, el plasma puede estar contenido entre dos electrodos, con un electrodo conectado a tierra separando el objeto a tratar del plasma, de tal manera que no se aplique tensión significativa a ningún objeto situado aguas abajo del dispositivo. Esto puede lograrse usando un dispositivo de plasma tal como el descrito por Ladwig y col. (Surface & Coatings Technology 201 (2007) 6460-6464), y sería adecuado para el tratamiento de sustratos eléctricamente conductores que de otro modo podrían someterse a arco eléctrico.

[0039] Los parámetros del plasma (diseño del electrodo, frecuencia, tensión, composición del gas, etc.) pueden elegirse para controlar el proceso de plasma y asegurar que el plasma actúe de manera no térmica para producir un plasma a baja temperatura, que no afecta negativamente a los materiales sensibles a la temperatura que se están depositando.

[0040] Se describe un procedimiento para producir un sustrato recubierto, que comprende disolver al menos una biomolécula para formar una solución; nebulizar la solución con un gas para formar un aerosol líquido; introducir el aerosol líquido en una luminescencia plasmática para formar un recubrimiento; y depositar, en ausencia de monómeros reactivos, el recubrimiento sobre una superficie del sustrato. Mediante la introducción del aerosol líquido que comprende al menos una biomolécula aguas abajo de una salida de la cámara de plasma, es decir, a la luminescencia plasmática, se minimiza el daño a las biomoléculas. Esto permite que se depositen recubrimientos que comprenden biomoléculas sensibles a la temperatura, iones, radicales libres y otras especies activas presentes en el aerosol líquido, donde de lo contrario se dañarían si el aerosol líquido se introdujera directamente en la cámara del plasma.

[0041] Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente aspectos de la presente descripción, pero no limitan la presente descripción.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. Deposición de colágeno sobre un implante ortopédico

[0042] Se disolvió colágeno (derivado bovino) en agua purificada para producir una solución que tenía una concentración de 1 mg/ml. La solución que contenía colágeno a continuación se transfirió a una jeringa y se bombeó a un dispositivo nebulizador neumático (T2100 producido por Burgener Research) a un caudal de 50 ml/min. El nebulizador creó una pulverización de aerosol usando helio como el gas de pulverización.

[0043] El aerosol resultante se introdujo en una descarga de plasma no térmico. El dispositivo de plasma comprendía un electrodo de clavija metálico alojado dentro de un recipiente dieléctrico de plástico. Se dejó que el gas inerte (helio) fluyera a través del recipiente a un caudal de 5 litros/min y se suministró potencia de radiofrecuencia (RF) al electrodo para producir una descarga de plasma. La potencia de RF se suministró a una frecuencia de ~18 kHz y 15 kV (pico a pico). Este dispositivo se ha descrito en detalle en otro lugar (O'Neill y O'Sullivan, Chem Vap Deposition, 2008, 15, pág. 1-6).

[0044] El dispositivo implantable era un tornillo de titanio que se trató inicialmente con un proceso denominado CoBlast (descrito en el documento WO 2008/033897) para asegurar el suministro de un acabado superficial de hidroxiapatita rugosa (HA). El tornillo tratado con HA se colocó luego al lado de la salida del dispositivo de plasma y se hizo girar a una velocidad de alrededor de 60 Hertz para asegurar una exposición uniforme al plasma y al aerosol.

[0045] Los tornillos tratados se implantaron entonces en el fémur de varios conejos usando una versión modificada del proceso descrito por Hunt et al. (Biomaterials, volumen 26, número 29, octubre de 2005, páginas 5890-5897). Se crearon agujeros piloto en cada fémur y los tornillos se insertaron a un par constante utilizando un medidor de fuerza. Para la comparación, se utilizaron los siguientes controles:

- (1) Tornillo de titanio sin tratar con acabado superficial anodizado.
- (2) Un recubrimiento de hidroxiapatita producido por el proceso descrito en el documento WO2008/033897, en lo sucesivo denominado "CoBlast HA".
- (3) Un recubrimiento de HA convencional de la industria producido por pulverización con plasma térmico, en lo sucesivo denominado "plasma HA".

[0046] Después de 14 días los animales se sacrificaron y se extrajeron los tornillos. La fuerza requerida para retirar cada tornillo se registró y los resultados se representan a continuación. Como es evidente en el gráfico, los dos recubrimientos de HA (Plasma y CoBlast) superaron significativamente al tornillo de Ti no tratado ya que ambas superficies de HA exhiben incrementos significativos en la fuerza de torsión requerida para retirar los tornillos. Aunque la fuerza media requerida para extraer la muestra de plasma HA fue ligeramente superior a la de las muestras de CoBlast, la muestra de plasma HA también mostró un alto grado de variabilidad que no es el resultado deseado. Véanse los datos de la Figura 1, que ilustran el par de extracción el día 14 para diversos sustratos tratados.

[0047] Aunque ambos tratamientos superficiales de HA mejoraron la fijación en etapas tempranas del implante de titanio, los valores más altos del par de torsión total fueron producidos por el recubrimiento de colágeno que se aplicó sobre la superficie de CoBlast. Esto indica que el tratamiento con colágeno produjo una fijación ósea

significativamente mejor. La fuerza de torsión también fue muy reproducible en estas muestras, lo que confirma que la superficie es altamente estable y reproducible. Cuando se compara con las otras tres superficies de control convencionales, es evidente que el colágeno depositado en plasma supera claramente a todas las demás muestras.

5 Ejemplo 2. Deposición de colágeno y fibronectina sobre PEEK y evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad.

[0048] Se limpiaron discos de poliéter éter cetona (PEEK) (diámetro 10 mm, espesor aproximadamente 5 mm) en agua ultrasónica, se aclararon con alcohol isopropílico (IPA) y se secaron al aire. Las muestras se dividieron entonces en 3 grupos: (1) recubrimiento de colágeno, (2) recubrimiento de fibronectina, (3) PEEK no modificado. Las muestras a recubrir con colágeno se trataron como sigue: Como en el Ejemplo 1, el colágeno se diluyó a una concentración de 1 mg/ml y se atomizó a una velocidad de 25 microlitros/minuto usando un nebulizador Burgener T2100. El aerosol resultante se pulverizó directamente en un plasma contenido dentro de una cámara de Teflon (diámetro de 16 mm y una longitud de 45 mm). El plasma se creó pasando aproximadamente 3 litros/minuto de helio a través de un electrodo de clavija metálica conectado a una fuente de alimentación PTI que produce alrededor de 15 kV (pico-pico) a una frecuencia de 18 kHz operando a una potencia de entrada de 60 W. Las muestras se expusieron a la mezcla de plasma y aerosol que salía de la cámara colocando el sustrato adyacente a la salida de plasma y cada muestra se revistió durante 1 minuto.

[0049] Se produjeron muestras de fibronectina de una manera similar, pero la solución de fibronectina contenía niveles significativos de NaCl y esta solución conductora produjo cierta formación de arco en la línea de suministro de líquido. Como consecuencia, la potencia del plasma y el tiempo de deposición se redujeron en comparación con el recubrimiento de colágeno. La potencia del plasma se redujo a 50 W, el caudal se aumentó a 35 microlitros/minuto y el tiempo de deposición se redujo a 30 segundos por muestra.

[0050] El análisis de SEM no mostró evidencias de alteraciones en la topografía superficial de las muestras de colágeno o fibronectina después del tratamiento, lo que sugiere que se había depositado un recubrimiento conformal. Sin embargo, el análisis XPS de las superficies mostró aumentos en los niveles de nitrógeno consistentes con la deposición de colágeno o fibronectina respectivamente sobre las superficies recubiertas de PEEK, como se muestra en la Tabla 1. También se detectaron trazas de cloro en las muestras de fibronectina consistentes con la presencia de sales en la solución de partida.

Tabla 1. Análisis XPS de muestras de PEEK

	PEEK	PEEK+Col	PEEK+Fib
C	87,7	74,5	65,9
O	12,3	17,7	12,8
N	0	7,8	20,0
Cl	0		1,4

[0051] Las muestras se sometieron entonces a un laboratorio académico independiente para estudios de cultivos celulares *in vitro*. Se sembraron las superficies con células pluripotenciales mesenquimales humanas, y se examinó la viabilidad celular y la proliferación durante un período de siete días. El tratamiento de las superficies de PEEK con colágeno o fibronectina parecía aumentar la viabilidad de las células en la superficie. Esto se atribuyó a un aumento de la proliferación celular en estas superficies cuando se compara con los datos de proliferación celular con PEEK no modificado, como se muestra en la Figura 2, para muestras *in vitro* a los días 0, 3 y 7.

[0052] La combinación de composición elemental de XPS y proliferación celular mejorada de los estudios *in vitro* confirma que la técnica de plasma descrita en este documento es capaz de depositar biomoléculas de peso elevado sobre una superficie como recubrimiento y también retiene la actividad biológica de las biomoléculas.

45 Ejemplo 3. Deposición de material autólogo

[0053] Se creó un dispositivo de plasma conectando una fuente de alimentación Redline G2000 a un pasador metálico insertado en un tubo de plástico de 10 mm de diámetro x 60 mm de longitud que se selló en un extremo excepto en un puerto de entrada de gas y en el pasador de metal. Se extrajo sangre entera de un voluntario sano y se almacenó en un tubo de recolección de sangre recubierto con heparina para prevenir la coagulación. La sangre a continuación se pulverizó a través de un nebulizador T2100 (Burgener Research) a una velocidad de 25 microlitros por minuto y el aerosol resultante se dirigió a través del orificio de entrada de gas al tubo de plástico junto con un flujo de 5 litros/minuto de helio. Los sustratos de vidrio se colocaron a 5 mm de la salida del tubo para recoger la muestra de sangre pulverizada. Cuando no se aplicó potencia (sin plasma), se encontró que la sangre se acumulaba

sobre el sustrato como un charco pulverizado húmedo. Sin embargo, cuando el plasma se formó dentro del tubo aplicando potencia (100 kHz, 45% del ciclo de trabajo) de la unidad de suministro de energía G2000, se encontró que alteraba directamente el estado de la sangre en aerosol. A niveles bajos de potencia aplicada (7,2 kV pico a pico), se encontró que el recubrimiento tenía una consistencia húmeda, similar a un gel. A mayores niveles de potencia (8,4 kV), el recubrimiento era un recubrimiento adherente seco. La microscopía óptica con una ampliación de 40x confirmó que el recubrimiento contenía numerosas células sanguíneas viables. A potencias mayores de 10 kV, se encontró que el recubrimiento estaba altamente curado y parecía estar fuertemente alterado por el plasma. Hubo un número significativamente reducido de células viables. Este análisis de XPS de las muestras de PEEK fue eficaz en el tratamiento con plasma de baja potencia (> 7,5 kV utilizando estos equipos) en producir un recubrimiento, pero potencias superiores (> 8 kV en este ejemplo) pueden dañar las biomoléculas o células vivas.

[0054] A los efectos de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades, porcentajes o proporciones y otros valores numéricos usados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener mediante la presente descripción. Como mínimo, y no como intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debe interpretar al menos a la luz del número de dígitos significativos reportados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

[0055] Se observa que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la", incluyen referentes plurales a menos que se limiten expresa e inequívocamente a un referente. Así, por ejemplo, la referencia a "una biomolécula" incluye dos o más biomoléculas diferentes. Como se usa en el presente documento, el término "incluir" y sus variantes gramaticales están destinados a ser no limitantes, de modo que la recitación de elementos en una lista no excluye otros elementos similares que pueden ser sustituidos o añadidos a los elementos enumerados.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una superficie bioactiva recubierta, que comprende:
 - 5 nebulizar una solución que contiene al menos una biomolécula disuelta para formar un aerosol líquido; combinar el aerosol líquido y un plasma no térmico a presión atmosférica para formar un recubrimiento; y depositar, en ausencia de monómeros reactivos, el recubrimiento sobre una superficie.
 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la biomolécula es una proteína.
 - 10 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la biomolécula es colágeno.
 4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la biomolécula es fibronectina.
 - 15 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la biomolécula es un polisacárido, un polipéptido o un aminoácido.
 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución contiene una mezcla de biomoléculas.
 - 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la solución contiene una mezcla de proteínas.
 8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la solución contiene una mezcla de una proteína y un polisacárido.
- 25

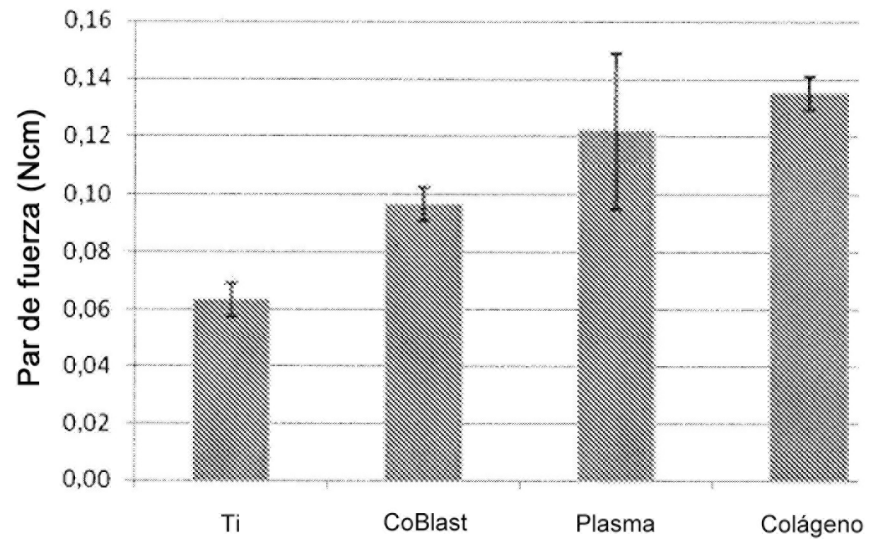


Figura 1.

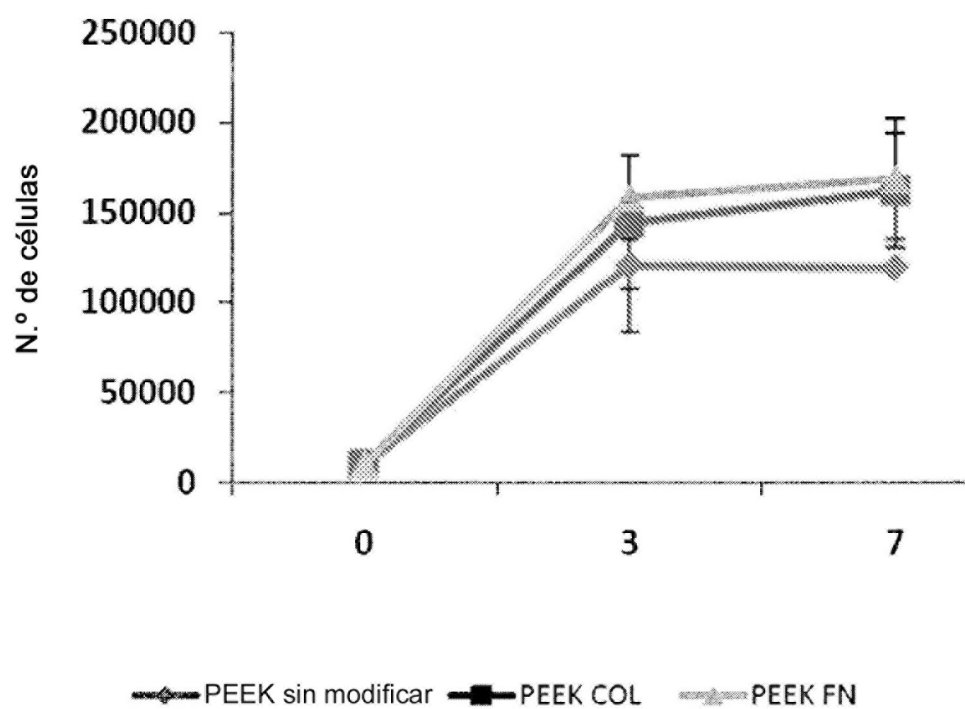


Figura 2.