

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 400**

51 Int. Cl.:

A61L 29/16	(2006.01) A61L 29/08	(2006.01)
A61L 27/34	(2006.01) A61L 31/02	(2006.01)
A61L 31/16	(2006.01) A61L 31/10	(2006.01)
C08F 293/00	(2006.01)	
C08F 30/02	(2006.01)	
C08F 230/02	(2006.01)	
A61L 27/04	(2006.01)	
A61L 27/06	(2006.01)	
A61L 27/54	(2006.01)	
A61L 29/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2013 PCT/US2013/071553**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14085275**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2013 E 13858070 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2925378**

54 Título: **Recubrimiento superficial multifuncional de implantes**

30 Prioridad:

30.11.2012 US 201261732239 P

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

03.06.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS MEDICAL
SCHOOL (100.0%)
225 Franklin Street, 12th Floor
Boston, MA 02110, US**

72 Inventor/es:

**SONG, JIE;
LIU, PINGSHENG y
AYERS, DAVID, C.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 764 400 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

Recubrimiento superficial multifuncional de implantes

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere, en general, a recubrimientos funcionales. Más particularmente, la invención se refiere a recubrimientos superficiales de polímeros zwitteriónicos para implantes y otros dispositivos que tienen propiedades contra la suciedad y bactericidas.

10

Antecedentes de la invención

La infección periprotésica de los implantes metálicos es una de las complicaciones más graves en la cirugía ortopédica. (Lynch, et al. **2008 Annual Review of Medicine** Vol. 59 415-428; Donlan 2001 *Clinical Infectious Diseases* 33, 1387-1392; Kurtz, et al. **2008 Journal of Arthroplasty** 23, 984-991). Se produce en de un 1 % a un 4 % de las artroplastias primarias y en hasta un 30 % de las artroplastias de revisión. Los pacientes que padecen infecciones periprotésicas normalmente se someten a múltiples procedimientos quirúrgicos con tasas de éxito variables, algunos requiriendo procedimientos de rescate devastadores, tales como fusión, resección de la artroplastia o incluso amputación. Aunque la contaminación microbiológica de los implantes puede ser el resultado de diversas causas que incluyen la insuficiente esterilización del implante, la contaminación durante la manipulación quirúrgica, el contacto directo de tejido infectado o un sitio de infección remoto, la formación de películas biológicas rodeando al implante es una amenaza común que hace que sea más probable que se produzcan infecciones locales y que sean más difíciles de erradicar.

15

20

25

30

La adsorción de bioincrustaciones sobre una superficie de implante ensuciada proporciona una capa condicionante para la colonización microbiana y la posterior formación de películas biológicas. Las bacterias incluidas en las películas biológicas pueden ser 2-3 órdenes de magnitud más difíciles de eliminar por la mayoría de antibióticos y biocidas, posiblemente debido a distintos mecanismos de acciones antimicrobianas. (Mah, et al. **2003 Nature** **426**, 306-310). El tratamiento de las infecciones mediadas por películas biológicas de los implantes ortopédicos normalmente requiere el reemplazo quirúrgico de los implantes contaminados, junto con una terapia con antibióticos prolongada, lo que se traduce en una hospitalización más prolongada, mayores costes médicos, deterioro funcional grave, morbilidad y aumento de la mortalidad para los pacientes.

35

40

Para prevenir dichos eventos devastadores, se llevan buscando desde hace tiempo modificaciones en la superficie del implante con el objetivo de reducir la bioincrustación y atenuar las posteriores respuestas inflamatorias adversas y los riesgos de infección. Los experimentos y modelos teóricos llevados a cabo con sistemas modelo bien controlados, tales como poli(etilenglicol) (PEG) hidrófilo o monocapas autoensambladas zwitteriónicas formadas sobre sustratos metálicos atómicamente planos, han dilucidado múltiples parámetros químicos y físicos que rigen la eficacia de la antiincrustación, incluyendo la correlación de la dinámica y la estructura del agua interfacial con propiedades no incrustantes. (Chen, et al. **2010 Polymer** 51, 5283-5293). La traducción clínica de estos hallazgos básicos, sin embargo, se ha visto impedida por la complejidad topológica y de composición de las superficies de los implantes metálicos comerciales y por el sofisticado ambiente tisular dinámico que no puede simularse por sencillos sistemas de modelo. El documento de patente US 2010/0145286 divulga recubrimientos en capas antiincrustación, antimicrobianos y antitrombogénicos.

45

Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad no satisfecha de estrategias viables de modificación superficial que aborden de manera simultánea y adecuada las necesidades de antiincrustación y bactericida.

Sumario de la invención

50

La invención de acuerdo con las reivindicaciones, proporciona nuevos recubrimientos superficiales que tienen cepillos de polímero superficiales con cadenas laterales zwitteriónicas y conjugadas a antibióticos y propiedades antiincrustación y bactericidas sinérgicas. Los recubrimientos superficiales pueden prepararse usando polimerización "viva" iniciada en superficie altamente eficaz. El diseño de los cepillos de polímero superficial es altamente modular, permitiendo el ajuste independiente de las propiedades antiincrustación y bactericidas (por ejemplo, variando la naturaleza química del motivo zwitteriónico y el agente antibiótico), de la química a través de la cual se conjuga el agente antibiótico a las cadenas laterales de polímero, del peso molecular de los cepillos de polímero (por ejemplo, el espesor del recubrimiento y la densidad de los respectivos motivos funcionales) y la disposición espacial de los respectivos motivos funcionales (por ejemplo, homopolímeros, copolímeros de bloque, copolímeros aleatorios) para lograr un resultado antiinfeccioso óptimo y sostenido para una aplicación dada.

60

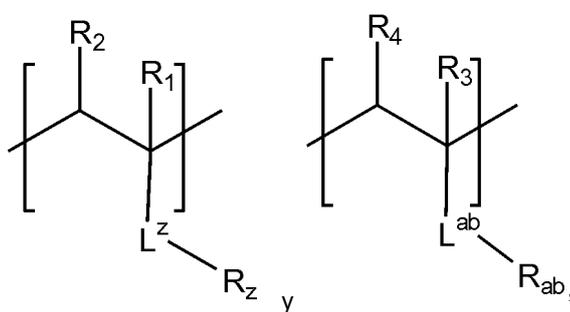
La estrategia de recubrimiento divulgada en el presente documento puede aplicarse ampliamente a una variedad de implantes y dispositivos, tales como implantes metálicos y sintéticos, tornillos, fijadores y dispositivos quirúrgicos sin afectar a su integridad estructural y mecánica, facilitando la posterior traducción clínica de esta tecnología para beneficiar a las poblaciones tanto militares como civiles.

65

En un aspecto, la invención se refiere en general a una composición antiincrustación y bactericida que comprende un polímero zwitteriónico que comprende restos antibacterianos. El polímero zwitteriónico puede ser cualquier polímero adecuado injertado con grupos zwitteriónicos, de acuerdo con las reivindicaciones. El polímero es un copolímero (por ejemplo, un copolímero aleatorio o un copolímero de bloque). Los grupos zwitteriónicos usados para injertar el polímero son grupos zwitteriónicos adecuados, tales como fosforilcolina, sulfobetaina y carboxibetaina.

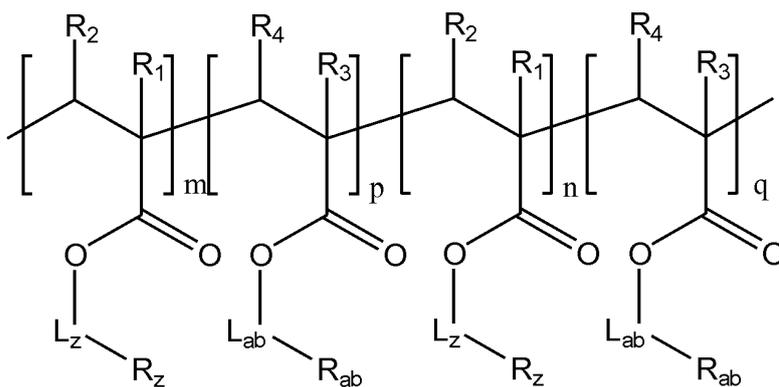
En otro aspecto, la invención se refiere en general a una superficie antiincrustación y bactericida de un sustrato sólido. La superficie tiene una capa de cepillos de polímero que comprende polímeros zwitteriónicos antiincrustación y/o conjugados de polímero antibacterianos. La superficie puede ser una superficie de cualquier sustrato adecuado, metálico o no metálico, sintético o no sintético. En ciertas realizaciones preferidas, el sustrato sólido es un implante médico o un componente del mismo, tal como un catéter, una endoprótesis vascular, un implante dental, un implante ortopédico.

De acuerdo con las reivindicaciones, la invención se refiere en general a un sustrato de implante que tiene unida covalentemente en su superficie una capa de un copolímero que comprende unidades repetitivas que tienen las estructuras de:



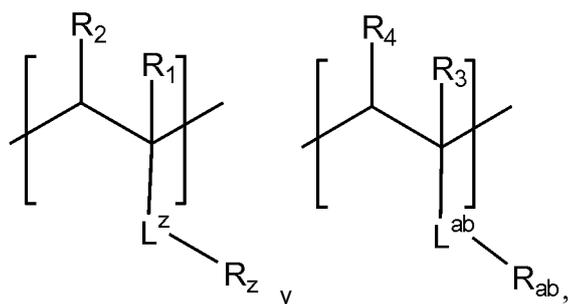
en donde
 cada uno de R₁, R₃ es independientemente un hidrógeno, alquilo, alquiloxi;
 cada uno de R₂, R₄ es independientemente un hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₅), alquiloxi (C₁-C₁₅);
 L^z es un grupo enlazador;
 L^{ab} es un grupo enlazador;
 R_z es un grupo colgante que comprende un grupo zwitteriónico; y
 R_{ab} es un grupo colgante que comprende un resto antibacteriano.

En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero comprende la estructura:



en donde cada uno de m, n, p y q es un número entero seleccionado de aproximadamente 0 a aproximadamente 500.

En otro aspecto más, la invención se refiere en general a un copolímero que comprende unidades repetitivas que tienen las estructuras de:



en donde

cada uno de R_1 , R_3 es independientemente un hidrógeno, alquilo, alquiloxi;

5 cada uno de R_2 , R_4 es independientemente un hidrógeno, alquilo (C_1 - C_{15}), alquiloxi (C_1 - C_{15});

L^z es un grupo enlazador;

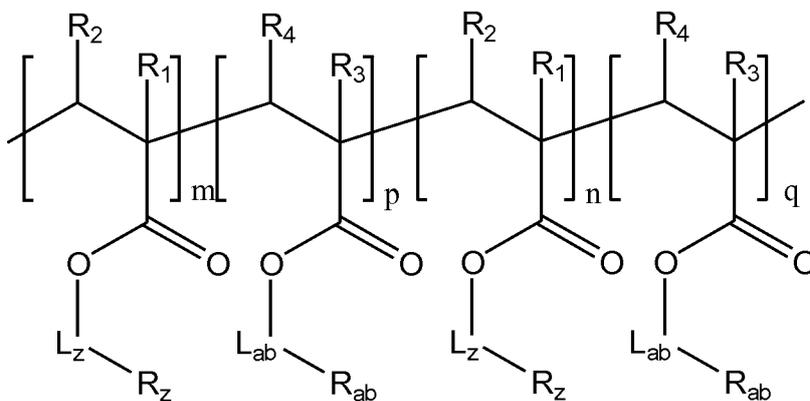
L^{ab} es un grupo enlazador;

R_z es un grupo colgante que comprende un grupo zwitteriónico; y

R_{ab} es un grupo colgante que comprende un resto antibacteriano.

10

En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero tiene la estructura:



15 en donde cada uno de m , n , p y q es un número entero seleccionado de aproximadamente 0 a aproximadamente 500.

Breve descripción de las figuras

20 **FIG. 1.** Ilustración esquemática de cepillos de copolímero de bloque diseñado como recubrimientos superficiales antiincrustación y bactericidas para implantes de titanio y de aleación de titanio.

FIG. 2. Esquemas sintéticos representativos de las estrategias de modificación superficial paso a paso.

25 **FIG. 3.** Cambios de XPS (A) y de ángulo de contacto (B y C) que confirman la unión de iniciadores de ATRP terminados en Br- sobre superficies de Ti6Al4V y posterior injerto de cepillos zwitteriónicos polymerizados a partir de SBMA.

30 **FIG. 4.** La ATRP bien controlada de SBMA de monómero zwitteriónico llevada a cabo en un líquido iónico a temperatura ambiente (A y B) y a 60 °C (C) reveló un sobresaliente control sobre el PM, el índice de polidispersidad (M_w/M_n , PDI) y la cinética de polimerización dependiente de la temperatura (C).

35 **FIG. 5.** (A) Esquema sintético de ATRP de SMBA de monómero zwitteriónico llevada a cabo en HMIImCl al 10 % p/p en TFE a temperatura ambiente (ta) o a 60 °C. [SBMA]=1 M; [SBMA]:[EBiB]:[CuBr]:[BPY]=100:1:1:2. (B) Conversión de monómero (%) e índice de conversión de monómero $\ln([M]_0/[M])$ en función del tiempo de reacción a temperatura ambiente ("ta") (cuadrados) y a 60 °C (estrellas); (C) Peso molecular y PDI en función de la conversión de monómero (%) a ta (cuadrados) y a 60 °C (estrellas); (D) Trazados de GPC que monitorizan la reacción a ta; (E) Trazados de GPC que monitorizan la reacción a 60 °C. Se describen las condiciones de GPC detalladas en B2.5.

40 **FIG. 6.** Esquema sintético para la preparación del iniciador PA-O-Br.

FIG. 7. (A) Esquema sintético para injertar cepillos de pSBMA o copolímero de bloque pSBMA-*b*-pTFEMA de la

superficie de sustratos de Ti6A14V limpiados con plasma usando SI-ATRP; (B) Ilustración esquemática del injerto de cepillos de polímero zwitteriónico sobre un sustrato de Ti mediante SI-ATRP con polimerización en solución simultánea para formar polímero zwitteriónico "libre" mediante ATRP; (C) Trazados de GPC que muestran que pSBMA escindido del sustrato de Ti después de SI-ATRP muestran pesos moleculares y bajos PDI similares a los del pSBMA "libre" formado en la solución. Se describen las condiciones de GPC detalladas en B2.5.

FIG. 8. (A) Escaneos prospectivos de XPS, (B) espectros de XPS de alta resolución y (C) mediciones de ángulo de contacto con el agua (N=3) que confirman la unión covalente del iniciador de superficie terminado en Br (Ti-Br) y el posterior injerto de cepillos de pSBMA₂₀₀ zwitteriónico (DP=200) y de copolímero de bloque pSBMA₅₀-b-pTFEMA₁₀₀ (DP=50 para pSBMA y DP=100 para pTFEMA) sobre los sustratos de Ti6A14V mediante SI-ATRP. Todas las comparaciones por pares son significativas ($p < 0,05$, ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey) a menos que se indiquen como NS.

FIG. 9. Microscopía de fluorescencia (izquierda) y perfiles de línea de intensidad de fluorescencia (derecha) que muestran una absorción no específica sustancialmente reducida de BSA conjugado con fluoresceína sobre el sustrato de Ti6A14V tras el injerto en la superficie de pSBMA₂₀₀ (DP=200) sobre el sustrato metálico. Las imágenes se tomaron después de incubar durante una noche con 500 µg/ml de conjugado de BSA-fluoresceína en PBS, seguido por aclarado con PBS.

FIG. 10. Sitios de funcionalización potenciales de la vancomicina y estrategia sintética representativa propuesta para acoplar vancomicina alquilada en el sitio de N-vancosaminilo. Las flechas rojas indican los donantes/aceptores de enlace de H implicados en la unión a los extremos de L-Lys-D-Ala-D-Ala del peptidoglucano naciente. El grupo R también puede unirse a sitios de N-metileucilo y carboxilo. Puede usarse una gran variedad de grupos R que contienen C≡C bien como un grupo terminal o en una estructura cíclica restringida.

FIG. 11. (A) Conjugación de vancomicina a superficie de aleación de Ti con injerto de cepillo superficial de pTFEMA, (B) escaneos prospectivos de XPS, (C) escaneos de F_{1s} de alta resolución y (D) escaneos de N_{1s} de alta resolución de superficies de aleación de Ti de Ti-Br, injertadas con pTFEMA (Ti-pTFEMA) y funcionalizadas con vancomicina (Ti-Van).

FIG. 12. Síntesis y caracterización por HPLC de fase reversa de vancomicina alquilada.

FIG. 13. Síntesis y caracterización de monómero que contiene azida. (A) esquema sintético; (B) y (C) RMN de ¹H y ¹³C para TEG-N₃; (D) y (E) RMN de ¹H y ¹³C para AzTEGMA.

FIG. 14. Caracterización GPC de la cinética, la conversión y el índice de polidispersidad (PDI) de la solución de polimerización de AzTEGMA mediante ATRP.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un nuevo diseño de recubrimiento superficial de implantes multifuncional con propiedades antiincrustación y bactericidas ajustables para minimizar la formación de películas biológicas y la infección. En la superficie del implante se inmovilizan covalentemente cepillos de polímero de bloque funcional biocompatibles que forman bloques conjugados zwitteriónicos y bactericidas.

Para lograr un efecto antiincrustación de los implantes metálicos comerciales, los cepillos poliméricos con pesos moleculares estrechamente controlados aunque ajustables (espesor del recubrimiento) y con químicas de cadena lateral de baja incrustación se injertan preferentemente de manera covalente a la superficie del implante. La ausencia de estrategias fiables/robustas para anclar iniciadores de molécula pequeña al óxido superficial, la tendencia a la autooxidación de los recubrimientos superficiales a base de PEG en el ambiente fisiológico, perdiendo de este modo las propiedades antiincrustación con el paso del tiempo y el control inferior al óptimo de la polimerización iniciada en la superficie de cepillos poliméricos zwitteriónicos con baja incrustación (por ejemplo, amplias distribuciones de peso molecular) son los principales obstáculos a superar. (Hucknall, et al. **2009** *Advanced Materials* 21, 2441-2446; Herold, et al. **1989** *Biochemical Pharmacology* 38, 73-76; Wang, et al. **2003** *European Polymer Journal* 39, 2107-2114; Liaw, et al. **1993** *Polymer International* 30, 381-386).

Ya que ninguna superficie antiincrustación está libre de defectos superficiales, el riesgo de adhesión bacteriana y de infección mediada por incrustación sigue necesitando del diseño de recubrimientos superficiales que también sean bactericidas. La práctica más común para proporcionar implantes con propiedades bactericidas es mediante el encapsulado no covalente y la liberación de antibióticos cerca del implante. (Li, et al. **2010** *J of Controlled Release* 145, 221-230; Hanssen, et al. **2004** *Clin Orthop Relat Res* 427, 79-85). Dicha estrategia de suministro local, sin embargo, normalmente adolece de una cinética de liberación del fármaco subóptima y de efectos secundarios asociados (por ejemplo, la liberación explosiva podría ocasionar una toxicidad sistémica significativa y la rápida eliminación de la concentración local de fármaco mientras que una liberación demasiado lenta compromete la eficacia bactericida a corto plazo). (Anderson, et al. **2009** *Biomaterials* 30, 5675-5681; Penner, et al. **1996** *J of arthroplasty* 11, 939-944). Una estrategia alternativa que se está estudiando en la actualidad es el anclaje covalente

de antibióticos a la superficie del implante, lo que normalmente implica unir enlazadores de molécula pequeña a óxidos metálicos superficiales, seguido de conjugación del fármaco usando química de esterificación/amidación convencional. (Antoci, et al. **2008** *Biomaterials* 29, 4684-4690; Antoci, et al. **2007** *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 81-87; Edupuganti, et al. **2007** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17, 2692-2696; Jose, et al. **2005** *Chemistry & Biology* 12, 1041-1048; Antoci, et al. **2007** *Journal of Orthopaedic Research* **25**, 858-866). Dicho enfoque limita la densidad superficial conseguible de antibióticos a los sitios de óxido superficial disponibles. Además, dichos recubrimientos de superficie no impiden la unión de bacterias muertas o la acumulación de películas biológicas, ya que no tienen una naturaleza antiincrustación. De hecho, aunque los implantes modificados covalentemente con vancomicina usando dicha estrategia reducen de hecho las infecciones *in vivo* a corto plazo (durante un par de semanas), no logran inhibir completamente la infección a largo plazo. (Antoci, et al. **2007** *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 88-95). De hecho, las densidades subóptimas de antibióticos unidos covalentemente pueden aumentar el riesgo de desarrollar resistencia a fármacos.

Una estrategia paralela para abordar las infecciones periprostéticas es el suministro local de antibióticos, mediante encapsulación no covalente/liberación del fármaco cerca de la superficie del implante o mediante el anclaje covalente del fármaco sobre el implante. El suministro local no covalente de antibióticos normalmente adolece de una cinética de liberación de fármaco subóptima y de efectos secundarios asociados (por ejemplo, la liberación explosiva podría dar lugar a una toxicidad sistémica significativa y a una rápida eliminación de la concentración de fármaco local, mientras que una liberación demasiado lenta compromete la eficacia bactericida a corto plazo y aumenta el riesgo a largo plazo de desarrollar resistencia a fármacos). El anclaje covalente existente de antibióticos sobre superficies metálicas implica unir enlazadores de molécula pequeña a óxidos metálicos superficiales, seguido de conjugación del fármaco usando química de esterificación/amidación convencional. Dicho enfoque limita la densidad superficial conseguible de antibióticos a los sitios de óxido superficial disponibles y el rendimiento de la química de acoplamiento. Las evaluaciones *in vivo* de implantes modificados con vancomicina usando dicha estrategia reveló propiedades antibacterianas mejoradas a corto plazo, lo que respalda la conservación de la bioactividad de la vancomicina tras la modificación covalente, pero también la incapacidad para inhibir completamente la infección a largo plazo, resaltando las limitaciones de esta estrategia. (Antoci, et al. **2007** *Clin. Orthop. Relat. Res.* 88-95). De hecho, las densidades subóptimas de antibióticos unidos covalentemente también aumentan el riesgo de desarrollar resistencia a fármacos.

Los retos asociados con los recubrimientos superficiales antiincrustación y antibacterianos se abordan empleando polimerización iniciada en la superficie de cepillos de polímero zwitteriónico con baja incrustación y presentación covalente de antibióticos con mayor densidad (por ejemplo, vancomicina). La estrategia de recubrimiento general se aplica a una gran variedad de implantes.

Los cepillos de polímero de bloque se fabrican mediante polimerización de transferencia de átomo iniciada en la superficie, haciendo que los cepillos sean bien controlables y ajustables en cuanto al peso molecular, la longitud de la cadena, así como el espesor del recubrimiento en la superficie del implante. Esta característica es crítica para lograr un equilibrio óptimo de las propiedades antiincrustación y bactericidas para reducir infecciones.

La vancomicina se conjuga al cepillo mediante una reacción "clic", que proporciona una fabricación altamente eficaz de una densa superficie antimicrobiana. La densidad de la vancomicina en el recubrimiento polimérico es altamente ajustable mediante un fácil control del peso molecular (unidad repetida) del bloque de polímero. Puede lograrse una mayor densidad de la vancomicina mediante esta estrategia en comparación con la inmovilización directa de una monocapa de vancomicina a la superficie metálica (Antoci, et al. **2007** *Clin. Orthop. Relat. Res.* 88-95), haciendo que sus propiedades bactericidas sean mucho más potentes.

Estas estrategias se implementan, como se ilustra en la **FIG. 1**, de un modo sinérgico para lograr propiedades antiincrustamiento y bactericidas sinérgicas del recubrimiento superficial, optimizando de este modo el resultado antiinfeccioso. Técnicamente, se seleccionó para lograr esta meta una técnica de polimerización iniciada en la superficie altamente controlada (SI-ATRP) y una química "clic" de alta fidelidad.

Para injertar polímeros antiincrustamiento/antibacterianos sobre implantes metálicos, se seleccionó polimerización de radical de transferencia de átomo iniciada en la superficie (SI-ATRP) para controlar de manera precisa la longitud de la cadena polimérica (peso molecular/PM), el índice de polidispersidad (PDI), la densidad de grupos funcionales de cadena lateral y la formación de bloques de los cepillos de polímero superficial (por ejemplo, copolímeros de bloque frente a aleatorios). Se desarrolló un protocolo robusto para acoplar enlazadores a base de ácido fosfónico de molécula pequeña con terminales de bromuro a superficies de aleación de Ti6Al4V como iniciadores unidos en la superficie para la SI-ATRP (**FIG. 2**).

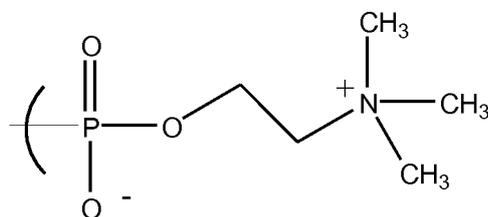
La consistencia de la unión superficial del enlazador de molécula pequeña y la consiguiente conversión a iniciadores de SI-ATRP se validaron mediante el cambio en la humectabilidad superficial (ángulo de contacto) y la composición química superficial (espectroscopía fotoelectrónica de rayos X), como se muestra en la **FIG. 3**. Los iniciadores de ATRP unidos a la superficie resultantes (**2**, **FIG. 2**) fueron lo suficientemente estables como para soportar su sonicación/calentamiento en varios disolventes, haciendo que sean idóneos para las modificaciones superficiales propuestas mediante SI-ATRP.

Los recubrimientos antiincrustación eficaces se exploraron injertando cepillos de polímero zwitteriónicos con diferentes espesores (PM), químicas de cadena lateral (PMC, SB frente a CB, **FIG. 2**) y densidades de empaquetamiento. Usando un líquido iónico como disolvente optimizado, se prepararon polímeros zwitteriónicos mediante ATRP con un control significativamente mejorado sobre la cinética de polimerización, la conversión, el PM y un PDI extremadamente reducido PDI ($M_w/M_n \sim 1,1$) como se muestra en la **FIG. 4**. Esto aborda un reto principal en la síntesis controlada de polímeros zwitteriónicos.

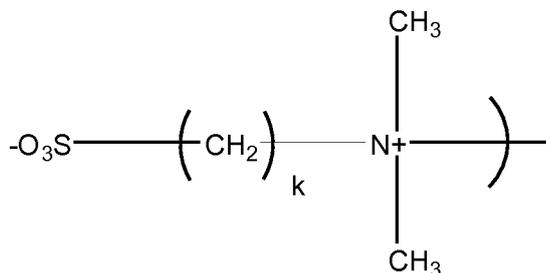
En un aspecto, la invención se refiere en general a una composición antiincrustación y bactericida que comprende un polímero zwitteriónico que comprende restos antibacterianos.

El polímero zwitteriónico puede ser cualquier polímero adecuado injertado con grupos zwitteriónicos. El polímero puede ser un homopolímero o un copolímero (por ejemplo, un copolímero aleatorio o un copolímero de bloque). Los grupos zwitteriónicos usados para injertar el polímero pueden ser grupos zwitteriónicos adecuados, tales como fosforilcolina, sulfobetaina y carboxibetaina.

La fosforilcolina tiene la estructura de

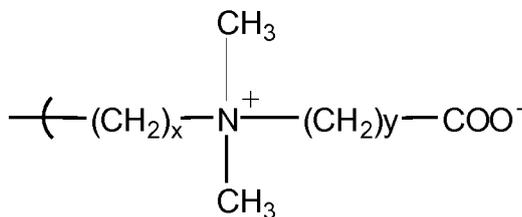


La sulfobetaina tiene la estructura:



en donde k es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 15.

La carboxibetaina tiene la estructura:



en donde y es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 15.

De acuerdo con las reivindicaciones, los polímeros comprenden tanto cadenas laterales zwitteriónicas como cadenas laterales con restos antibacterianos unidos covalentemente. Puede usarse cualquier resto bactericida adecuado, tal como los seleccionados entre antibióticos de beta-lactama, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol, ivermectina y rifamicinas.

En algunas realizaciones, el polímero zwitteriónico tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 300.000 Da (por ejemplo, de aproximadamente 2.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 5.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 20.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 50.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 75.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de

aproximadamente 100.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 150.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 200.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 250.000, de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 200.000, de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 150.000, de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 125.000 Da, de aproximadamente 100.000 Da a aproximadamente 75.000 Da, de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 50.000 Da, de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 25.000 Da, de aproximadamente 1.000 Da a aproximadamente 10.000 Da, de aproximadamente 5.000 Da a aproximadamente 300.000 Da, de aproximadamente 5.000 Da a aproximadamente 250.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 250.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 200.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 150.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 100.000 Da, de aproximadamente 10.000 Da a aproximadamente 50.000 Da).

En otro aspecto, la invención se refiere en general a una superficie antiincrustación y bactericida de un sustrato sólido. La superficie tiene una capa de un polímero zwitteriónico que comprende restos antibacterianos.

La superficie puede ser una superficie de cualquier sustrato adecuado, metálico o no metálico, sintético o no sintético. En ciertas realizaciones, el sustrato sólido es un sustrato metálico (por ejemplo, acero inoxidable, titanio, cobalto, cromo, tantalio, magnesio y/o níquel o una aleación de los mismos). En ciertas realizaciones, el sustrato sólido es un sustrato de polímero sintético (por ejemplo, UHMWPE, UHMWPE reticulado, poliuretanos, PEEK, polilactidas, poliésteres).

En ciertas realizaciones preferidas, el sustrato sólido es un implante médico o un componente del mismo, tal como un catéter, una endoprótesis vascular, un implante dental, un implante ortopédico.

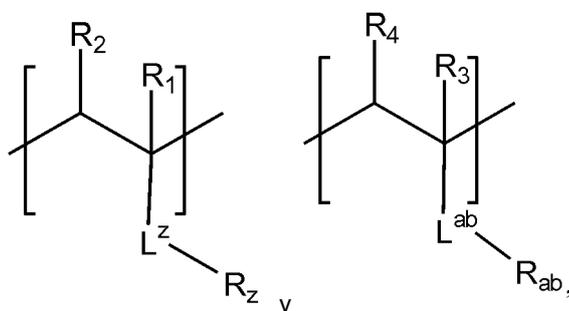
Los implantes metálicos óseos, articulares y dentales ejemplares incluyen: placas de fijación, clavo IM, tornillos, prótesis de reemplazo articular total; empastes/composites dentales; jaulas metálicas de fusión espinal. Los implantes ortopédicos ejemplares incluyen: un implante para el reemplazo total de rodilla (TKR), reemplazo total de cadera (THR), reemplazo total de hombro (TSR), reemplazo total de codo (TER), reemplazo total de muñeca (TWR), reemplazo total de tobillo (TAR) o un componente de los mismos.

El polímero zwitteriónico puede estar unido covalentemente a la superficie del sustrato o recubierto no covalentemente sobre la superficie del sustrato.

Los grupos zwitteriónicos usados para injertar el polímero pueden ser grupos zwitteriónicos adecuados, tales como fosforilcolina, sulfobetaina y carboxibetaina.

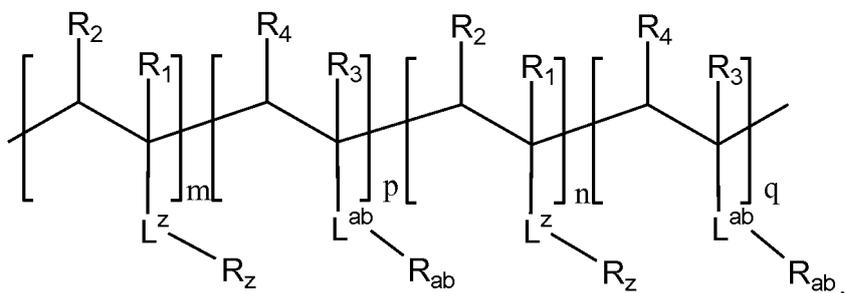
En ciertas realizaciones preferidas, los polímeros injertados en la superficie comprenden tanto cadenas laterales zwitteriónicas como cadenas laterales con restos antibacterianos unidos covalentemente. Puede usarse cualquier resto bactericida adecuado, tal como los seleccionados entre antibióticos de beta-lactama, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol, ivermectina y rifamicinas.

De acuerdo con las reivindicaciones, la invención se refiere en general a un sustrato de implante que tiene unida covalentemente en su superficie una capa de un copolímero que comprende unidades repetitivas que tienen las estructuras de:



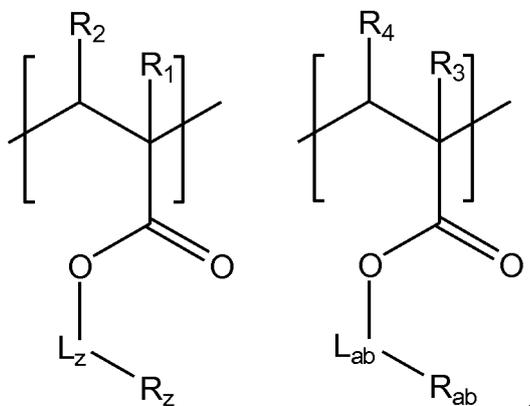
en donde
 cada uno de R₁, R₃ es independientemente un hidrógeno, alquilo, alquiloxi;
 cada uno de R₂, R₄ es independientemente un hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₅), alquiloxi (C₁-C₁₅);
 L^z es un grupo enlazador;
 L^{ab} es un grupo enlazador;
 R_z es un grupo colgante que comprende un grupo zwitteriónico; y
 R_{ab} es un grupo colgante que comprende un resto antibacteriano.

En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero comprende la estructura:



5 en donde cada uno de m, n, p y q es un número entero seleccionado de aproximadamente 0 a aproximadamente 500 (por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500).

En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero comprende unidades de estructuras repetitivas:



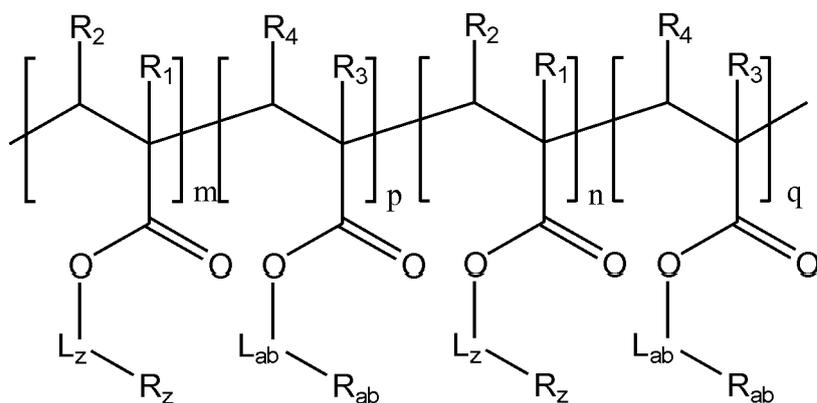
10

en donde

L_z es un grupo enlazador; y
 L_{ab} es un grupo enlazador.

15

En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero comprende la estructura:

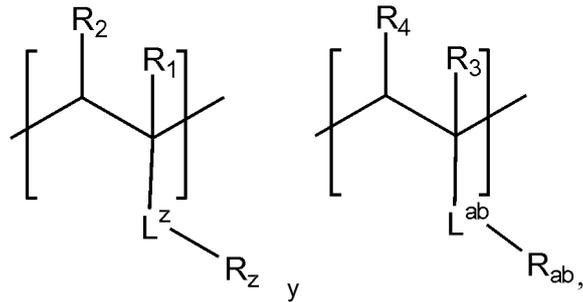


20 en donde cada uno de m, n, p y q es un número entero seleccionado de aproximadamente 0 a aproximadamente 500 (por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500).

En ciertas realizaciones preferidas, cada uno de R_1 , R_3 , R_2 y R_4 es hidrógeno, cada uno de L_z y L_{ab} es independientemente $-(CH_2)_i$, en donde i es un número entero de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 6, 10, 12, 15, 18, 20). En ciertas realizaciones preferidas, al menos uno de R_1 , R_3 , R_2 y R_4 no es hidrógeno.

25

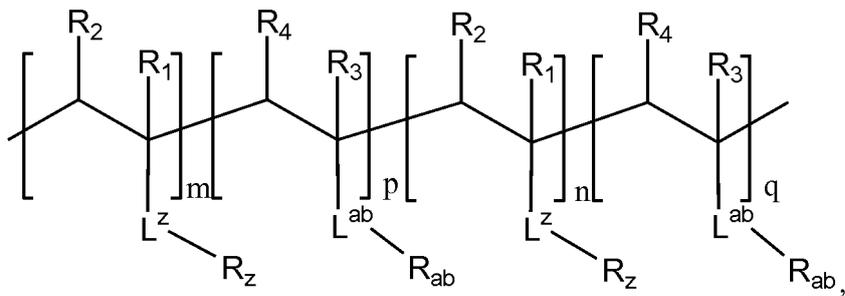
De acuerdo con las reivindicaciones, la invención se refiere en general a un copolímero que comprende unidades repetitivas que tienen las estructuras de:



en donde

- 5 cada uno de R_1 , R_3 es independientemente un hidrógeno, alquilo, alquiloxi;
 cada uno de R_2 , R_4 es independientemente un hidrógeno, alquilo (C_1 - C_{15}), alquiloxi (C_1 - C_{15});
 L^z es un grupo enlazador;
 L^{ab} es un grupo enlazador;
 R_z es un grupo colgante que comprende un grupo zwitteriónico; y
 10 R_{ab} es un grupo colgante que comprende un resto antibacteriano.

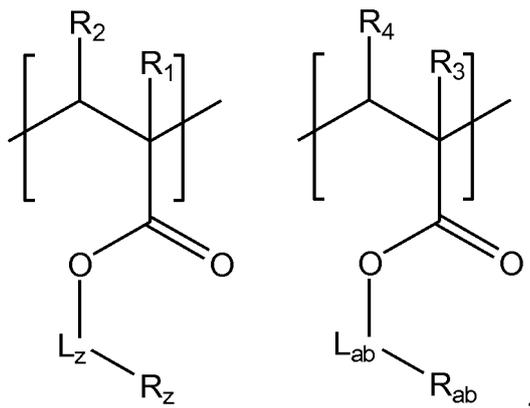
En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero tiene la estructura:



- 15 en donde cada uno de m , n , p y q es un número entero seleccionado de aproximadamente 0 a aproximadamente 500 (por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500).

En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero comprende unidades de estructuras repetitivas:

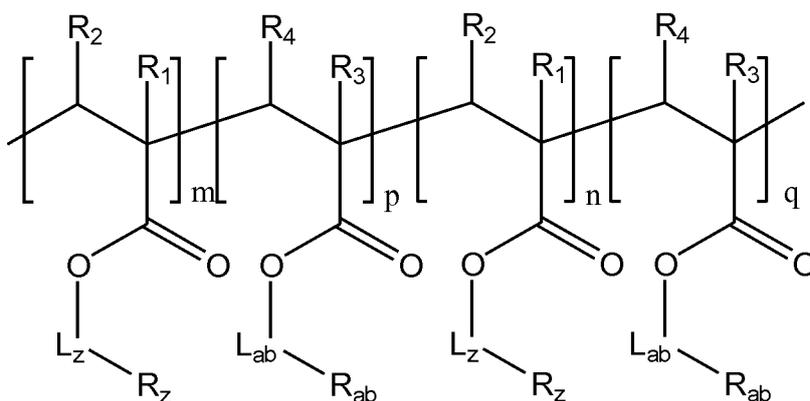
20



en donde

- 25 L_z es un grupo enlazador; y
 L_{ab} es un grupo enlazador.

En ciertas realizaciones preferidas, el copolímero tiene la estructura:



en donde cada uno de m, n, p y q es un número entero seleccionado de aproximadamente 0 a aproximadamente 500 (por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500).

5

En ciertas realizaciones preferidas, el resto antibacteriano es vancomicina o un derivado de la misma.

Ejemplos

10 Preparación bien controlada de polímeros de pSBMA zwitteriónicos mediante ATRP en líquido iónico

Las polimerizaciones por radicales de monómeros de vinilo zwitteriónicos que contienen grupos sulfobetaina, carboxibetaina y fosfobetaina normalmente dio como resultado polímeros con amplias distribuciones de peso molecular (PDI o $M_w/M_n > 1,5$). (Wang, et al. **2003** *European Polymer Journal* 39, 2107-2114; Liaw, et al. **1993** *Polymer International* 30, 381-386). Incluso usando procesos de polimerización viva controlada, tal como polimerización de radicales de transferencia de átomo (ATRP), ha sido difícil obtener polímeros zwitteriónicos con una polidispersidad reducida (PDI < 1,2) debido a las fuerzas iónicas únicas y el comportamiento de solubilidad de los monómeros y polímeros zwitteriónicos en medios de reacción convencionales. Por ejemplo, los monómeros y polímeros zwitteriónicos son insolubles en disolventes orgánicos no polares y son solubles únicamente en un número limitado de disolventes próticos, tales como soluciones acuosas, pero tienden a autoagregarse a causa de sus bajas fuerzas iónicas y fuertes interacciones electrostáticas atractivas en agua. Recientemente se ha demostrado que el fluoroalcohol y los líquidos iónicos son eficaces para estudiar dichas interacciones fuertes entre los grupos zwitteriónicos, mejorando de este modo la solubilidad tanto de los monómeros como de los polímeros y permitiendo una polimerización bien controlada de los monómeros zwitteriónicos mediante ATRP. (Terayama, et al. **2011** *Macromolecules* 44, 104-111).

25

Usando cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio (HMIImCl) al 10 % p/p en 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) como disolvente y α -bromoisobutirato de etilo (EBiB) como iniciador (**FIG. 5A**), se preparó con éxito pSBMA mediante ATRP con altas conversiones de monómero y bajo PDI. Brevemente, se disolvió 2,2'-bipiridina (BPY) en TFE en un matraz Schlenk y se desgasificó mediante tres ciclos de "congelación-bombeo-descongelación" para extraer el oxígeno. Después, se volvió a rellenar el matraz con argón y se añadió CuBr. La mezcla se agitó durante 10 min para asegurar la formación del complejo de catalizador de cobre. Después, se disolvieron monómero de SBMA (1 M; objetivo de DP=100), iniciador de α -bromoisobutirato de etilo (EBiB) y HMIImCl en TFE con agitación a temperatura ambiente en otro matraz Schlenk para lograr una relación de [SBMA]:[EBiB]:[CuBr]:[BPY] de 100:1:1:2 y una concentración en líquido iónico de HMIImCl del 10 % p/p en TFE. El matraz se desgasificó mediante tres ciclos de "congelación-bombeo-descongelación" antes de añadir mediante una jeringa el complejo de catalizador de cobre. La polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente o a 60 °C. Se recogió una alícuota de la mezcla de reacción para el control por RMN 1H y por GPC en diversos puntos de tiempo. El reactor se expuso a aire para terminar la polimerización después de 6-8 h. La solución de polimerización se precipitó en metanol para obtener el polímero de pSBMA. Usando este proceso, se logró una conversión de monómero del 90 % con un peso molecular de ~17 kDa en 6 h a 60 °C, con una PDI extremadamente baja de ~1,15 (**FIG. 5B, 5C, y 5E**). Alterando la proporción de monómero e iniciadores, se prepararon pSBMA con diversos grados de polimerizaciones (DP=50, 100 o 200) con conversiones de monómero tan elevadas como del 97-99 % cuando se extendió el tiempo de polimerización hasta 18 h a 60 °C. Una relación lineal entre el índice de conversión de monómero $\ln([M]_0/[M])$ y el tiempo de reacción tanto a temperatura ambiente como a 60 °C reveló una cinética de polimerización de primer orden (**FIG. 5B**, azul), estando la tasa de conversión de monómero correlacionada positivamente con las temperaturas de reacción (**FIG. 5B-5D**). La mayor temperatura de reacción dio lugar a polímeros con un peso molecular ligeramente mayor que las reacciones a temperatura ambiente, con PDI igualmente estrechos (**FIG. 5C y 5E**). Las altas afinidades de TFE y HMIImCl por SBMA y pSBMA han asegurado posiblemente un medio de polimerización homogéneo, dando como resultado una ATRP estrechamente controlada.

40

Injerto bien controlado de cepillos superficiales de polímero o copolímero de bloque zwitteriónico en Ti6A14V

mediante SI-ATRP

La ATRP de 6 h a 60 °C usando HMIImCl al 10 % p/p en TFE como disolvente, unas condiciones identificadas anteriormente como óptimas para preparar pSBMA en solución, se aplicó para injertar cepillos superficiales de pSBMA zwitteriónico y de copolímero de bloque anfífilo en Ti6A14V usando SI-ATRP.

A2.1. Preparación del sustrato de aleación de Ti6A14V: Se cortó una placa de Ti6A14V (1,3 mm de espesor, Titanium Metal Supply Inc.) en cuadrados de 10 x 10 mm², se pulieron secuencialmente bajo agua con lijas de carburo de silicio de grano 600, 1500 y 3000 y se limpiaron secuencialmente por ultrasonidos con hexano (10 min), diclorometano (10 min) y acetona (10 min). Después, se hibridaron los sustratos a 120 °C en un horno y se limpiaron con aire-plasma durante 2 min en una cámara de plasma Harrick PDC-001 (Harrick Plasma, Ithaca, NY).

Preparación del iniciador de ácido (2-bromo-2-metilpropanoiloxi)metilfosfónico (PA-O-Br)

Se ha usado una serie de anclajes de molécula pequeña para unir cepillos de polímero a superficies metálicas, incluyendo 3,4-dihidroxifenilalanina (un componente proteico adhesivo del mejillón), anaquelina (un quelante de hierro de cianobacterias) y enlazador de silano aminopropilado. (Dalsin, et al. **2003** *Journal of the American Chemical Society* 125, 4253-4258; Dalsin, et al. **2005** *Langmuir* 21,640-646; Fan, et al. **2005** *Journal of the American Chemical Society* 127, 15843-15847; Wach, et al. **2008** *Chemistry-a European Journal* 14, 10579-10584; Zurcher, et al. **2006** *Journal of the American Chemical Society* 128, 1064-1065; Wach, et al. **2008** *Angewandte Chemie-International Edition* 47, 7123-7126; Antoci, et al. **2008** *Biomaterials* 29, 4684-4690; Antoci, et al. **2007** *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 81-87; Edupuganti, et al. **2007** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17, 2692-2696; Jose, et al. **2005** *Chemistry & Biology* 12, 1041-1048). En este caso, se seleccionó un anclaje de molécula pequeña a base de ácido fosfónico debido a su fuerte afinidad de unión a los óxidos metálicos superficiales de Ti6A14V y a su facilidad de funcionalización para introducir un bromuro terminal para permitir la SI-ATRP.

Se disolvió 2-bromo-2-metilpropanoato de (dietoxifosforil)metilo (1,06 g, 3,34 mmol), preparado a partir de (hidroximetil)fosfonato de dietilo y purificado siguiendo procedimientos de la bibliografía con un rendimiento del 64 %, en 20 ml de diclorometano anhidro en un matraz seco antes de inyectar bromotrimetilsilano (1,86 g, 12 mmol). (Kim, et al. **2010** *Langmuir* 26, 2083-2092). Se dejó proceder la reacción en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante una noche (**FIG. 6**). Después de retirar el disolvente al vacío, se añadió metanol anhidro (15 ml) al producto y se agitó durante una noche. El aceite de color amarillento obtenido tras retirar el disolvente se purificó mediante recristalización en diclorometano, proporcionando cristales de color blanco del iniciador de PA-O-Br con un rendimiento del 47 %. RMN ¹H (400 MHz, metanol-d₄): δ 4,40-4,38 (d, 2H), 1,94 (s, 6H) ppm; RMN ¹³C (100 MHz, metanol-d₄): δ 171,1, 60,1, 58,5, 55,2, 29,9 ppm; RMN ³¹P (170 MHz, metanol-d₄): δ 14,9 ppm. EM (IEN, m/z): C₅H₁₀BrO₅P [M + H]⁺, calculado 261,09; observado 261,01.

Inmovilización superficial del iniciador de PA-O-Br sobre sustratos de Ti6A14V

Los sustratos de Ti6A14V hibridados y limpiados con plasma (40 trozos) se colocaron en 40 ml de solución en metano anhidro 3 mM de PA-O-Br en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h, permitiendo que el grupo de ácido fosfónico se uniese a la fina capa de óxido de la superficie de Ti6A14V. Después, se recogieron los sustratos de la solución de PA-O-Br y se hibridaron a 110 °C durante 15 min, seguido de una sonicación extensa en metano (10 min cada vez, dos veces). Después, se secaron los sustratos con Br inmovilizado al vacío y se usaron inmediatamente para la SI-ATRP posterior.

Injerto de cepillos de polímero de pSBMA o cepillos de polímero de bloque de pSBMA-b-pTFEMA en sustratos de Ti6A14V con Br inmovilizado mediante SI-ATRP

El injerto de cepillos de polímero zwitteriónico o de cepillos de copolímero de bloque mediante SI-ASRP se ilustra esquemáticamente en la **FIG. 7A**. La preparación del complejo de catalizador de cobre se llevó a cabo como se describe en la sección A1. También se disolvió el monómero de metacrilato de sulfobetaina (SBMA), el iniciador libre EBiB y HMIImCl en TFE en proporciones idénticas a las descritas en la sección A1 y se desgasificaron y combinaron con el complejo de catalizador de cobre. La mezcla se agitó durante 1 min antes de transferirse rápidamente a un reactor de fondo plano que contenía varios trozos de sustratos de Ti6A14V con Br inmovilizado (Ti-Br) en atmósfera de argón. Se llevaron a cabo procesos de ATRP y SI-ATRP en solución simultáneos (**FIG. 7B**) tanto a ta como a 60 °C. Se recogió una alícuota de la mezcla de reacción para la monitorización mediante RMN ¹H y GPC de la formación de pSBMA en solución en diversos puntos de tiempo. Tras terminar las polimerizaciones mediante exposición a aire, se precipitó la solución de polimerización en metanol para obtener pSBMA libre, mientras que se lavaron los sustratos con injerto de pSBMA con TFE usando un aparato Soxhlet durante 24 h para retirar del sustrato cualquier polímero libre adsorbido no covalentemente y se secó al vacío. El injerto de los cepillos de polímero de bloque de pSBMA-b-pTFEMA al sustrato se llevó a cabo de un modo similar alimentando monómero de TFEMA hidrófobo a sustratos con injerto de pSBMA (Ti-pSBMA).

Para escindir los polímeros injertados en la superficie para la caracterización de la eficacia de SI-ATRP, se colocaron los sustratos de Ti-pSBMA en un tubo de plástico de 50 ml con 30 ml de solución iónica de liberación de ácido (NaCl

0,2 M y HCl 2 M en agua) y se agitó suavemente en un agitador orbital a temperatura ambiente. La solución se recogió después de 3 días, se neutralizó con hidróxido de sodio y se dializó en un tubo de membrana de diálisis (Spectra/Por 6, MWCO: 1000) frente a agua Milli-Q durante 3 días (cambiando el agua Milli-Q 3 veces al día) antes de liofilizarse. Los análisis por GPC del pSBMA injertado en la superficie escindido y del pSBMA "libre" formado en la solución mostró pesos moleculares similares y PDI igualmente bajos (**FIG. 7C**, PDI 1,15 frente a 1,18), lo que respalda que las SI-ATRP se llevaron a cabo con un control excelente.

Propiedades superficiales de los sustratos de Ti6Al4V injertados superficialmente con cepillos de pSBMA zwitteriónico o de copolímero de bloque de pSBMA-b-pTFEMA

La exitosa unión superficial de los iniciadores terminados con Br y el posterior injerto de los cepillos de polímero mediante SI-ATRP se validaron mediante análisis de la composición química mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS, **FIG. 8A y 8B**) y por los cambios en la humectabilidad superficial medida mediante los ángulos de contacto con el agua (**FIG. 8C**).

Los picos de XPS característicos para Br_{3d} y P_{2p} que estaban ausentes del sustrato de Ti6Al4V no modificado se detectaron en el sustrato de Ti-Br (**FIG. 8A**). Tras el injerto de pSBMA, se detectaron fácilmente las señales de S_{2p} y N_{1s} características de las sulfobetainas (**FIG. 8A y 8B**) mientras que las señales de Br_{3d} y P_{2p} se volvieron apenas detectables (**FIG. 8A**), lo que respalda el injerto de cepillos superficiales de pSBMA con una profundidad y cobertura superficial sustancial. Tras el injerto de un segundo bloque de pTFEMA, apareció la señal correspondiente a F_{1s} mientras que se redujo la intensidad relativa para las señales de S_{2p} y N_{1s} (**FIG. 8A y 8B**), lo que es coherente con una buena cobertura superficial por el bloque de pTFEMA fluorado.

Las mediciones de ángulo de contacto con el agua (N=3) fueron coherentes con la superhidrofilia de las superficies con injerto de pSBMA y la rápida restauración de su hidrofobia tras el injerto de un segundo bloque de pTFEMA hidrófobo (**FIG. 8C**). Las estrechas desviaciones típicas observadas en los ángulos de contacto de múltiples especímenes respaldan la cobertura consistente de la superficie por los respectivos cepillos de polímero injertados.

Incrustación reducida de los sustratos de Ti6Al4V tras el injerto superficial de pSBMA

Se incubaron especímenes de Ti6Al4V con y sin pSBMA₂₀₀ injertados en la superficie con 1 ml de solución en PBS de conjugado de seroalbúmina bovina (BSA)-fluoresceína (500 µg/ml) a 37 °C durante una noche. Después, se enjuagaron los sustratos con PBS fresco (pH=7,4) tres veces para retirar la BSA poco adsorbida. Las proteínas fluorescentes unidas a la superficie se observaron mediante microscopía de fluorescencia (**FIG. 9**, izquierda) y se cuantificaron las intensidades fluorescentes relativas entre las superficies mediante perfilado de líneas usando ImageJ (**FIG. 9**, derecha). Los datos revelaron una reducción significativa en la absorción no específica de BSA sobre la superficie con injerto de pSBMA, lo que respalda la naturaleza de baja incrustación del recubrimiento de cepillo superficial de polímero de pSBMA. Debido a que la unión bacteriana sobre un sustrato puede producirse mediante una capa de proteína adsorbida, se espera que las superficies resistentes a la adsorción de proteínas también sean resistentes a la adsorción de bacterias, aunque para cualquier superficie dada, el grado de resistencia a las bacterias no se correlaciona necesariamente de manera lineal con la resistencia a las proteínas. (Chapman, et al. **2001 Langmuir** **17**, 1225-1233; Ostuni, et al. **2001 Langmuir** **17**, 6336-6343). Por lo tanto, se investigará en estudios posteriores de qué modo las superficies recubiertas con polímero zwitteriónico resisten a la adhesión bacteriana en paralelo con su resistencia a la adsorción de proteínas.

Funcionalización de vancomicina

Hay tres sitios principales para la funcionalización química potencial de vancomicina, el sitio de N-vancosaminilo, el sitio de N-metileucilo y el sitio de carboxilo (**FIG. 10**). Por ejemplo, el sitio de N-vancosaminilo se alquila haciendo reaccionar la vancomicina a temperatura ambiente con 1,1 equivalentes de éster de propargil-NHS o de éster de dibencilciclooctina-NHS (éster de DBCO-NHS) (Click Chemistry Tools, Scottsdale, AZ) en DMF con 20 equivalentes de trietilamina durante una noche. Además de las químicas clic de azido-alquino, también pueden aplicarse otras químicas de conjugación de alta fidelidad, incluyendo, pero sin limitación, acoplamiento de tiol-eno, adición de Michael de un enolato de nucleófilo de carbono con un carbonilo electrófilo, reacción de Diels-Alder, formación de base de Schiff de una amina primaria o secundaria nucleófila con un aldehído o una cetona. También puede llevarse a cabo amidación convencional con cepillos terminados en éster activados, tales como pTFEMA. Entre las químicas clic azido-alquino, pueden usarse químicas promovidas por tensión tanto catalizadas por cobre(I) como sin cobre con una gran variedad de grupos alquínico terminales y aquinos cíclicos restringidos.

Para conjugar la vancomicina a la aleación de Ti con injerto de cepillo de pTFEMA, se disolvió vancomicina (0,15 mmol) en TFE (10 ml) con agitación, en lo que se sumergieron los sustratos de aleación de Ti con injerto de cepillo de pTFEMA durante 24 h (**FIG. 11A**). Los sustratos se recogieron y extrajeron con TFE reciente durante 24 h para retirar la vancomicina físicamente adsorbida. Los sustratos resultantes se secaron al vacío y se caracterizaron mediante XPS. El análisis por XPS reveló la apariencia esperada de la señal de F_{1s} tras el injerto de pTFEMA a la superficie de Ti-Br (**FIGS. 11B y C**) y el aumento en la intensidad de señal de N_{1s} tras la conjugación de la vancomicina a la superficie de Ti-pTFEMA (**FIGS. 11B y D**).

Para facilitar la conjugación alternativa de la vancomicina al sustrato mediante química clic de azida-alquino, se preparó vancomicina alquinilada (**FIG. 12**). A una solución de vancomicina-HCl (0,33 mmol) en DMF seca (6 ml) se le añadió éster activo de éster de propargil-NHS (0,36 mmol) y trietilamina (0,66 mmol). Después de hacer reaccionar durante 24 h a *ta* en atmósfera inerte de argón, se retiró el disolvente a presión reducida y se precipitó el producto en metanol, se recogió y se liofilizó. El producto alquinilado se caracterizó mediante HPLC en fase reversa (columna analítica Varian Microsorb 100-5, C18 250 × 4,6 mm), mostrando la reducción esperada de la polaridad (y por tanto un tiempo de retención más prolongado; Agua: CH₃CN: TFA = 90:10:0.1; caudal, 1 ml/min). El producto alquinilado se purificó mediante HPLC preparativa (columna Varian Dynamax 250 x 21,4 mm).

Para preparar los cepillos superficiales funcionalizados con azida, se sintetizó monómero funcional de 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etanol (Az-TEGMA) a partir de 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)-etanol (TEG-Cl) mediante el intermedio de 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etanol (TEG-N₃) (**FIG. 13A**). En primer lugar, se añadió azida de sodio (0,69 mol) a una mezcla de agua (180 ml) y TEG-Cl (0,36 mol). La mezcla se agitó a 75 °C durante 48 h y después se enfrió a *ta*. Se evaporó/condensó el agua a presión reducida sobre gránulos de NaOH (0,2 g) para atrapar cualquier HN₃ potencialmente producido. La mezcla se suspendió en éter (300 ml). Después de la filtración, se concentró el filtrado mediante evaporación rotatoria para dar un líquido incoloro de TEG-N₃ con un rendimiento del 90,5 %. El TEG-N₃ se caracterizó completamente mediante RNM de ¹H y ¹³C (**FIG. 13 B y C**). Para obtener AzTEGMA, se añadieron TEG-N₃ (40 mmol), TEA (45 mmol) y 4-metilfenil (0,05 g) a 80 ml de benceno y se dejó enfriar a 0 °C. Se añadió gota a gota a la mezcla cloruro de metacrilato (48 mmol) en 20 ml de benceno. La reacción se calentó lentamente a *ta* y se agitó durante una noche. La mezcla resultante se filtró y el filtrado se concentró y sometió a purificación por cromatografía en columna de gel de sílice para dar el producto final con un rendimiento del 75,6 %. El producto de AzTEGMA se caracterizó completamente mediante RMN de ¹H y ¹³C (**FIG. 13 D y E**).

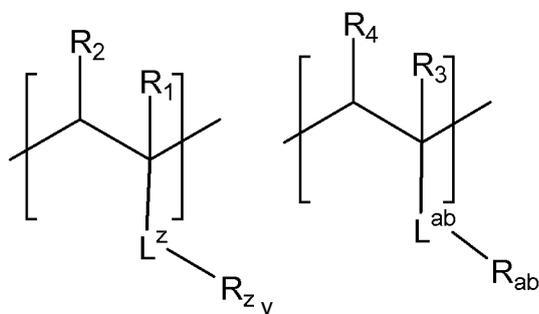
Se llevó a cabo la ATRP de AzTEGMA. Brevemente, se cargaron BPY (0,2 mmol) y TFE (1 ml) en un matraz Schlenk seco. Después de tres ciclos de "congelación-bombeo-descongelación" para retirar el oxígeno, se volvió a rellenar el matraz con argón, seguido de la adición de CuBr (0,1 mmol) con protección de argón. La mezcla se agitó hasta que se formó hasta que se formó un complejo de catalizador uniforme de color pardo oscuro. Se cargaron AzTEGMA (10 mmol), EBiB (0,1 mmol) y TFE (1 ml) en otro matraz Schlenk, se desgasificó mediante tres ciclos de "congelación-bombeo-descongelación", antes de inyectar el complejo de catalizador uniforme mediante una jeringa. La ATRP se produjo a *ta* y se recogieron alícuotas de la mezcla de reacción para la monitorización mediante RMN ¹H y por GPC con el paso del tiempo. La caracterización por GPC de la cinética de ATRP, la conversión y la polidispersidad (PDI) se muestra en la **FIG. 14**.

Obsérvese que la química clic que puede utilizarse en el presente documento abarca una gran variedad de reacciones que tienen amplias utilidades. Las reacciones clic se caracterizan por su selectividad, fácil implementación experimental, aplicabilidad en sistemas acuosos y aeróbicos, tolerancia a una variedad de grupos funcionales, rendimientos cuantitativos y elaboración sintética mínima. (Golas, et al. **2010 Chem. Soc. Rev.** 39, 1338.) En los últimos años, se han desarrollado diversas reacciones bioortogonales, ilustradas por la química clic. La capacidad para incorporar racionalmente marcadores reactivos a una diana biomolecular y posteriormente lograr una alta selectividad en la derivatización en una muestra biológica compleja ha revolucionado las herramientas disponibles para abordar problemas fundamentales. (Best **2009 Biochemistry** 48 (28), pp. 6571-6584). Las reacciones bien conocidas incluyen la reacción de hetero-Diels-Alder, el acoplamiento de tiol-eno, el ligamiento de Staudinger, el ligamiento químico nativo, la reacción de amidación entre tio ácidos y sulfonil azidas (sulfo-clic) y la cicloadición de alquino-azida catalizada por cobre(I) (CuAAC) y cicloadición de alquino-azida promovida por tensión sin cobre (SPAAC) (véase, por ejemplo, Dijk, et al. **2009 Bioconjugate Chem.** 20 (11), págs. 2001-2016; Hoyle, et al. **2010 Chem. Soc. Rev.** 39, 1355; Jewett, et al. **2010 Chem. Soc. Rev.** 39, 1272; Sumerlin, et al. **2010 Macromolecules** 43 (1), págs. 1-13; Hang, et al. **2001 Accounts of Chemical Research** 34, 727-73; y Kiick, et al. **2002 Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99, 2007-2010; Xu, et al. **2011 Macromolecules**, 44, 2660-2667; y Xu, et al. **2011 Chem-Asian J.** 6 (10), 2730-2737).

En la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

REIVINDICACIONES

1. Una composición antiincrustación y bactericida que comprende un polímero zwitteriónico que comprende restos antibacterianos en donde el polímero zwitteriónico es un copolímero que comprende unidades repetidas de las estructuras:



en donde

- 10 cada uno de R₁, R₃ es independientemente un hidrógeno, alquilo, alquiloxi;
- cada uno de R₂, R₄ es independientemente un hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₅), alquiloxi (C₁-C₁₅);
- L^z es un grupo enlazador;
- L^{ab} es un grupo enlazador;
- 15 R_z es un grupo colgante que comprende un grupo zwitteriónico; y
- R_{ab} es un grupo colgante que comprende un resto antibacteriano,

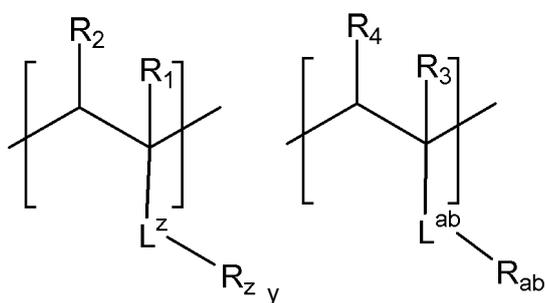
en donde

- 20 el grupo zwitteriónico se selecciona entre fosforilcolina, sulfobetaina y carboxibetaina y
- el resto antibacteriano se selecciona entre antibióticos de beta-lactama, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol, ivermectina, rifamicinas y vancomicina.

2. La composición antiincrustación y bactericida de la reivindicación 1, en donde el polímero zwitteriónico es un copolímero de bloque.

3. La composición antiincrustación y bactericida de la reivindicación 1, en donde la capa de copolímero zwitteriónico se enlaza de manera covalente o no covalente a una superficie de un sustrato.

4. Una superficie antiincrustación y bactericida de la un sustrato sólido, comprendiendo la superficie una capa de un polímero zwitteriónico que comprende restos antibacterianos, en donde el polímero zwitteriónico es un copolímero que comprende unidades repetidas de las estructuras:



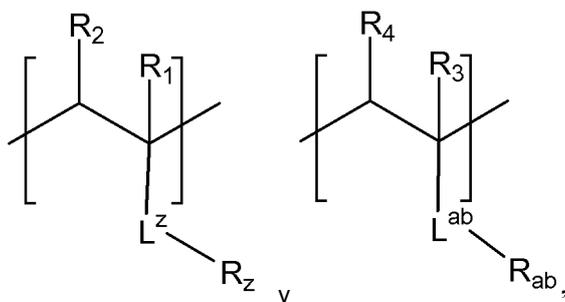
en donde

- 35 cada uno de R₁, R₃ es independientemente un hidrógeno, alquilo, alquiloxi;
- cada uno de R₂, R₄ es independientemente un hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₅), alquiloxi (C₁-C₁₅);
- L^z es un grupo enlazador;
- L^{ab} es un grupo enlazador;
- 40 R_z es un grupo colgante que comprende un grupo zwitteriónico; y
- R_{ab} es un grupo colgante que comprende un resto antibacteriano y

en donde

el grupo zwitteriónico se selecciona entre fosforilcolina, sulfobetaina y carboxibetaina y el resto antibacteriano se selecciona entre antibióticos de beta-lactama, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol, ivermectina, rifamicinas y vancomicina.

- 5 5. La superficie antiincrustación y bactericida de la reivindicación 4, en donde el sustrato sólido es un sustrato metálico o un sustrato polimérico sintético.
6. La superficie antiincrustación y bactericida de la reivindicación 5, en donde el sustrato polimérico sintético se selecciona entre UHMWPE, UHMWPE reticulado, poliuretanos, PEEK, polilactidas, poliésteres.
- 10 7. La superficie antiincrustación y bactericida de la reivindicación 4, en donde el sustrato sólido es un implante médico o un componente del mismo, en donde el implante médico o el componente del mismo es preferentemente un catéter, una endoprótesis vascular, un implante dental, un implante ortopédico.
- 15 8. La superficie antiincrustación y bactericida de la reivindicación 7, en donde el implante ortopédico es un implante para el reemplazo total de rodilla (TKR), reemplazo total de cadera (THR), reemplazo total de hombro (TSR), reemplazo total de codo (TER), reemplazo total de muñeca (TWR), reemplazo total de tobillo (TAR) o un componente de los mismos.
- 20 9. Un sustrato de implante que tiene unida covalentemente en su superficie una capa de un copolímero que comprende unidades repetitivas que tienen las estructuras de:

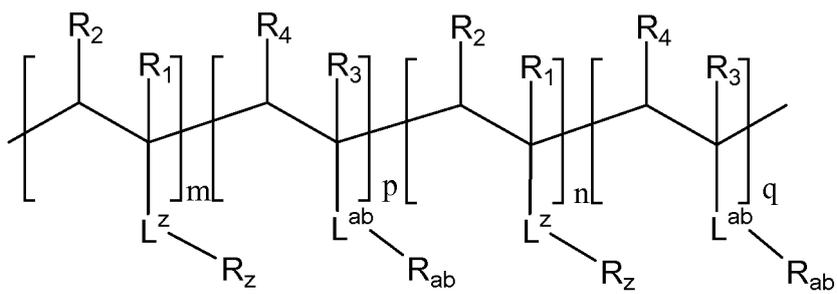


- 25 en donde
 cada uno de R₁, R₃ es independientemente un hidrógeno, alquilo, alquiloxi;
 cada uno de R₂, R₄ es independientemente un hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₅), alquiloxi (C₁-C₁₅);
 L^z es un grupo enlazador;
 L^{ab} es un grupo enlazador;
- 30 R_z es un grupo colgante que comprende un grupo zwitteriónico; y
 R_{ab} es un grupo colgante que comprende un resto antibacteriano

en donde

- 35 el grupo zwitteriónico se selecciona entre fosforilcolina, sulfobetaina y carboxibetaina y el resto antibacteriano se selecciona entre antibióticos de beta-lactama, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos, cloranfenicol, ivermectina, rifamicinas y vancomicina.

- 40 10. El sustrato de implante de la reivindicación 9, en donde el copolímero comprende la estructura:



en donde cada uno de m, n, p y q es un número entero seleccionado de aproximadamente 0 a aproximadamente 500.

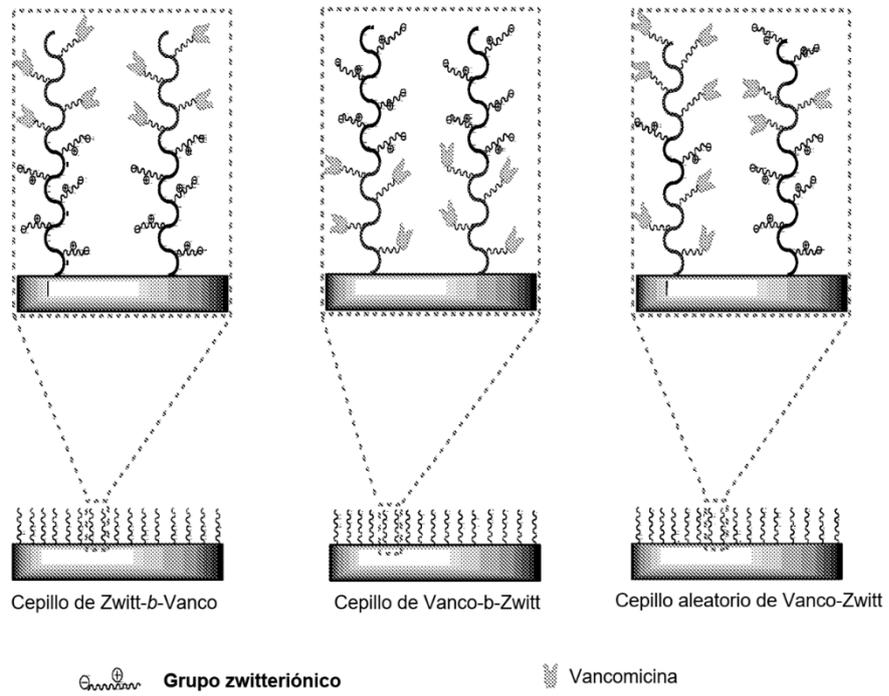


FIG. 1. Ilustración esquemática de cepillos de copolímero de bloque diseñados como recubrimientos superficiales contra el ensuciamiento y bactericidas para implantes de titanio y de aleación de titanio.

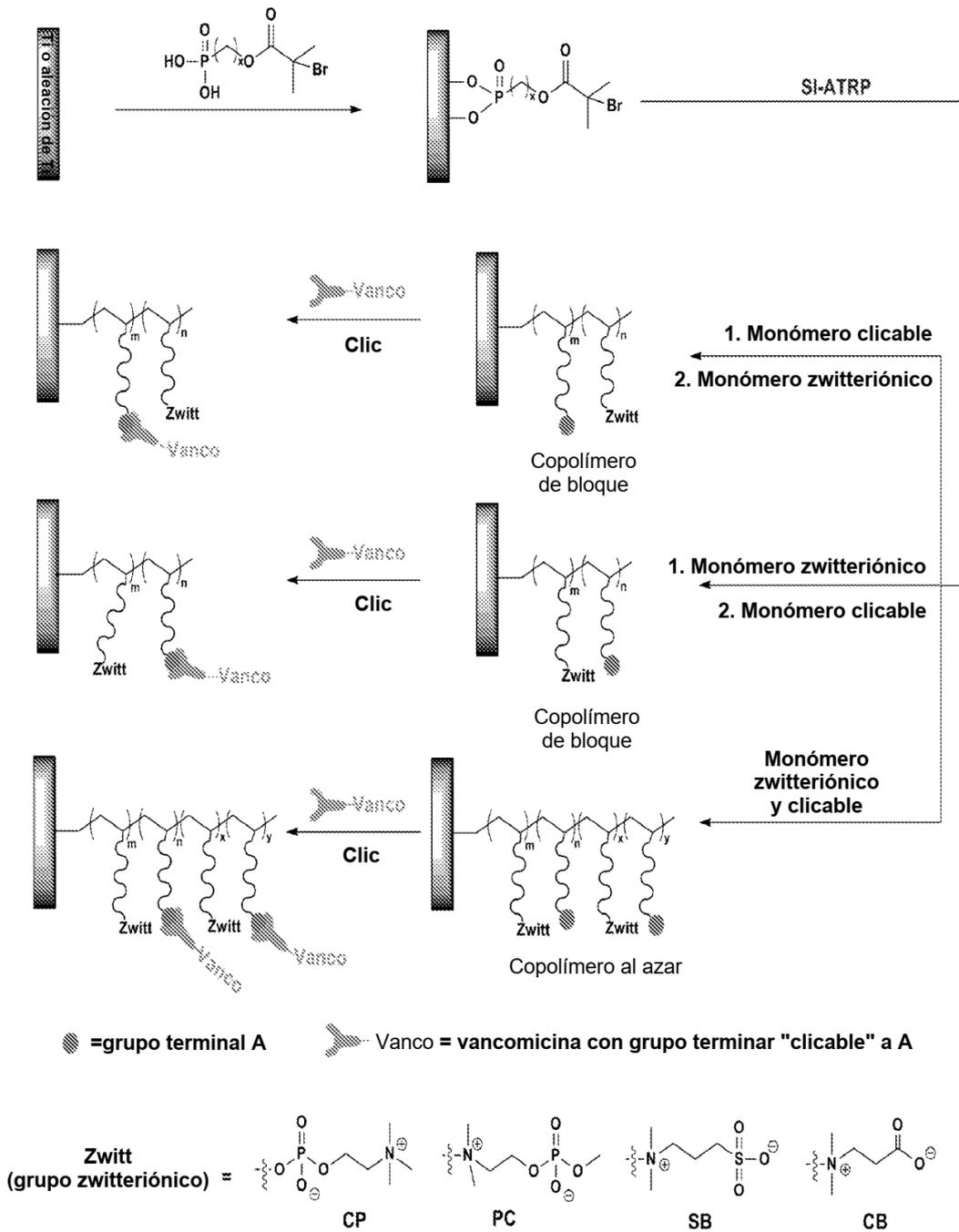


FIG. 2. Esquemas sintéticos representativos de las estrategias de modificación superficial paso a paso.

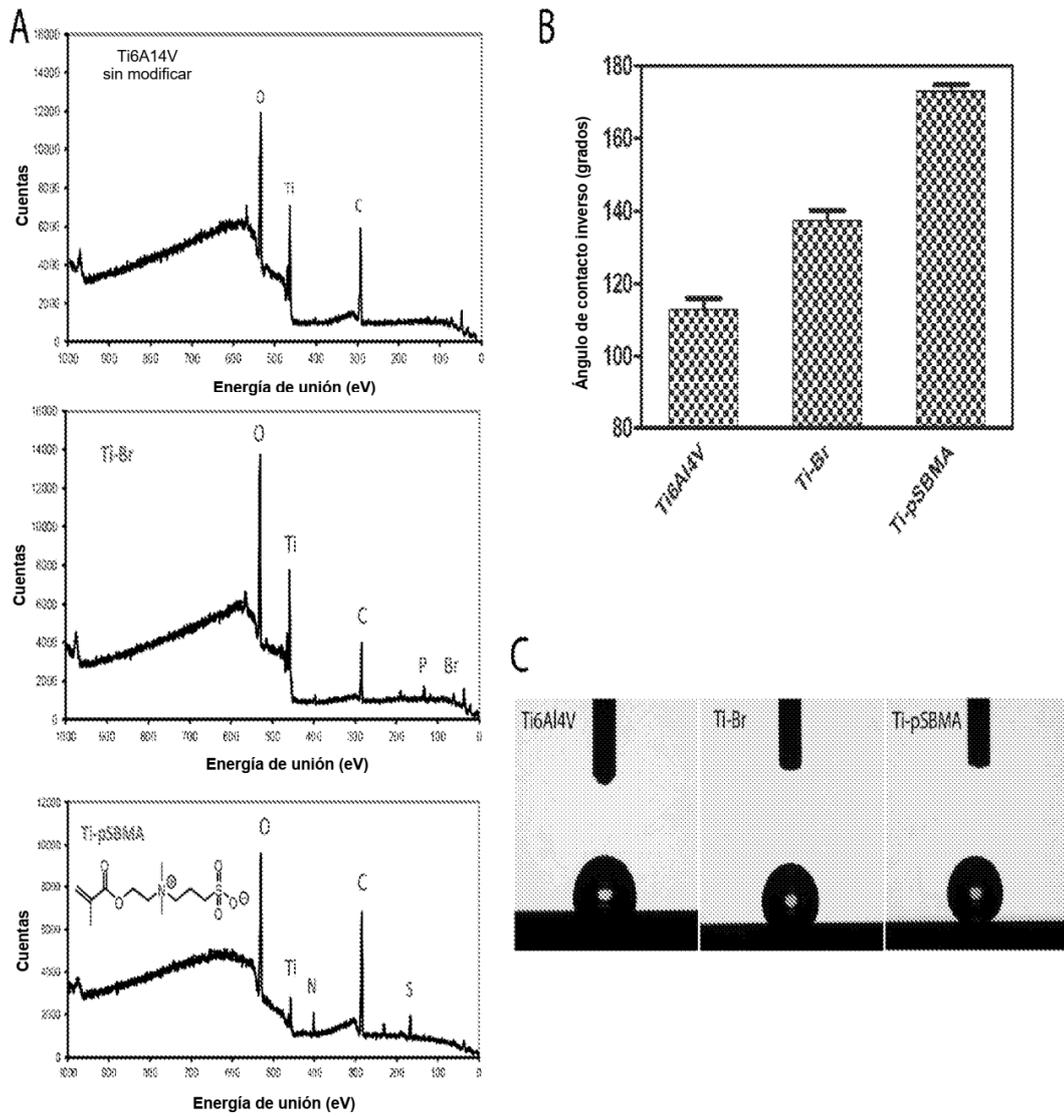


FIG. 3. Cambios de XPS (A) y de ángulo de contacto (B y C) que confirman la unión de iniciadores de ATRP terminados en Br- sobre superficies de Ti6Al4V y posterior injerto de cepillos zwitteriónicos polymerizados a partir de SBMA.

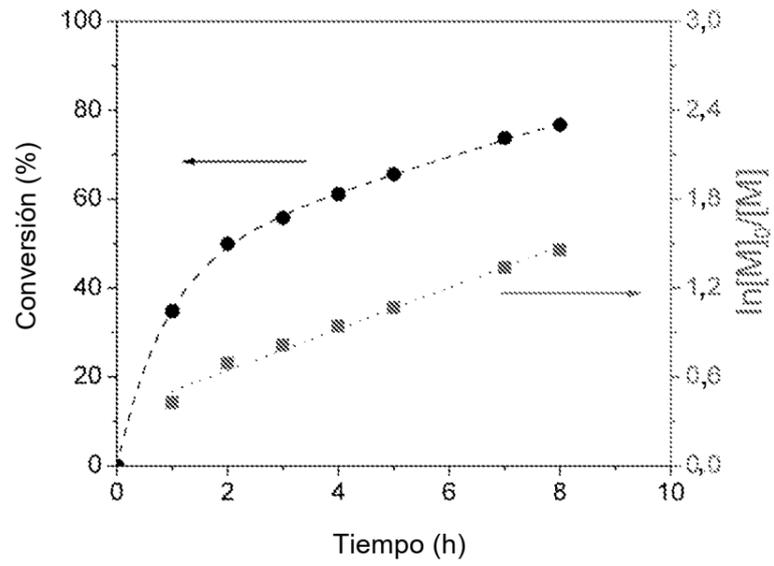


FIG. 4A

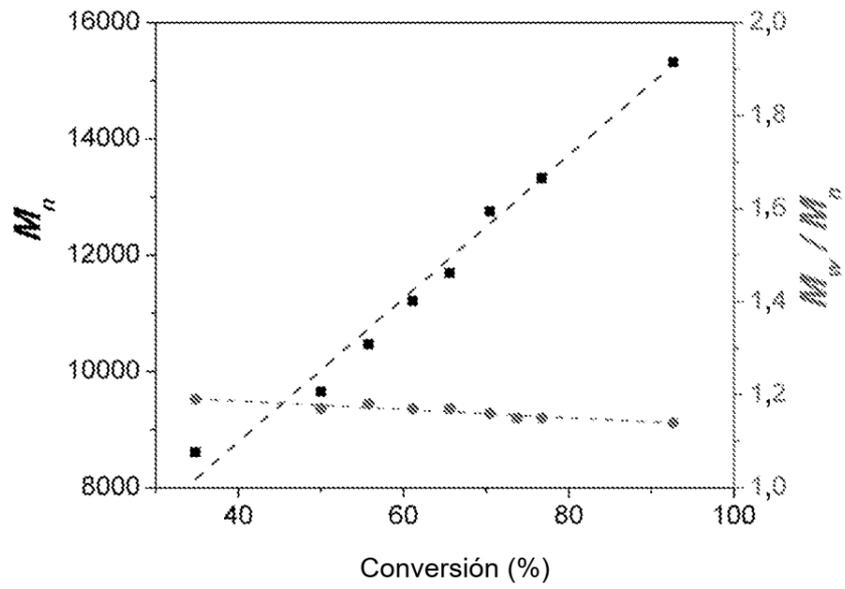


FIG. 4B

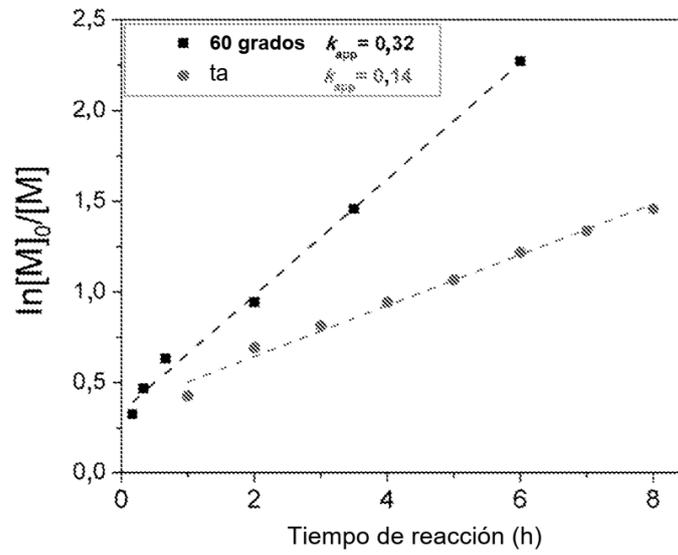


FIG. 4C

FIG. 4. La ATRP bien controlada de SBMA de monómero zwitteriónico llevada a cabo en un líquido iónico a temperatura ambiente (A y B) y a 60 °C (C) reveló un sobresaliente control sobre el PM, PDI (M_w/M_n) y cinética de polimerización dependiente de la temperatura (C).

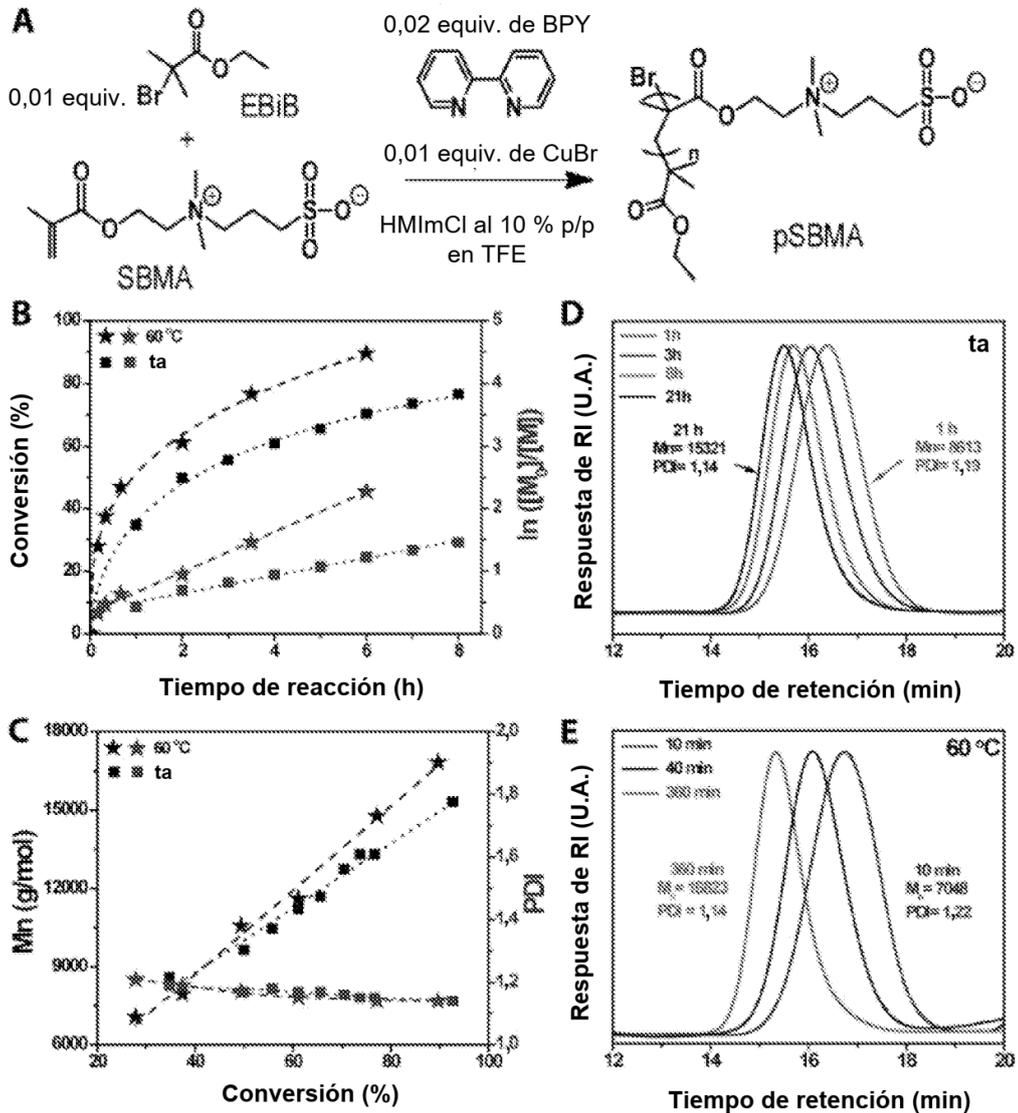


FIG. 5. (A) Esquema sintético de ATRP de SMBA de monómero zwitteriónico llevada a cabo en HMIImCl al 10 % p/p en TFE a temperatura ambiente (ta) o a 60 °C. [SBMA]=1 M; [SBMA]:[EBiB]:[CuBr]:[BPY]=100:1:1:2. (B) Conversión de monómero (%) e índice de conversión de monómero $\ln([M]_0/[M])$ en función del tiempo de reacción a ta (cuadrados) y a 60 °C (estrellas); (C) Peso molecular e índice PDI (PDI) en función de la conversión de monómero (%) a ta (cuadrados) y a 60 °C (estrellas); (D) Trazados de GPC que monitorizan la reacción a ta; (E) Trazados de GPC que monitorizan la reacción a 60 °C. Se describen las condiciones de GPC detalladas en B2.5.

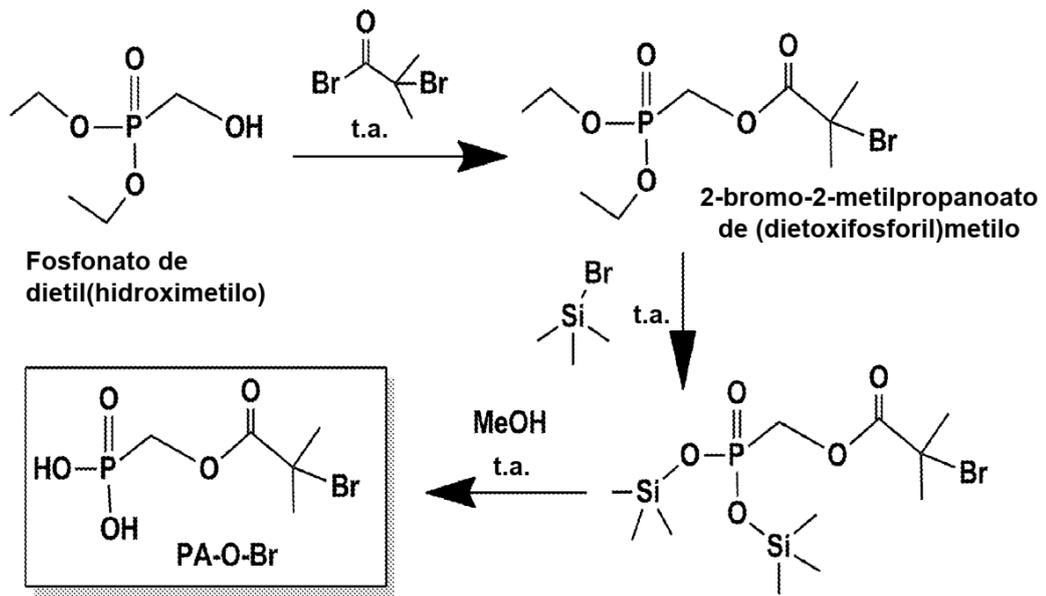


FIG. 6. Esquema sintético para la preparación del iniciador PA-O-Br.

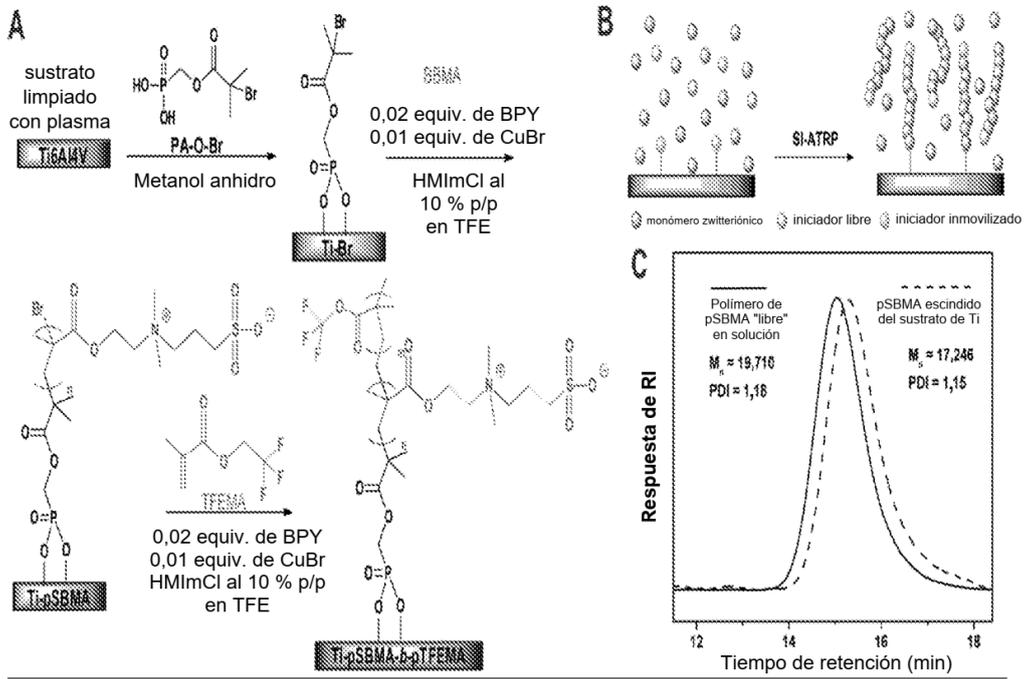


FIG. 7. (A) Esquema sintético para injertar cepillos de pSBMA o copolímero de bloque pSBMA-*b*-pTFEMA de la superficie de sustratos de Ti6Al4V limpiados con plasma usando SI-ATRP; (B) Ilustración esquemática del injerto de cepillos de polímero zwitteriónico sobre un sustrato de Ti mediante SI-ATRP con polimerización en solución simultánea para formar polímero zwitteriónico "libre" mediante ATRP; (C) Trazados de GPC que muestran que pSBMA escindido del sustrato de Ti después de SI-ATRP muestran pesos moleculares y bajos PDI similares a los del pSBMA "libre" formado en la solución. Se describen las condiciones de GPC detalladas en B2.5.

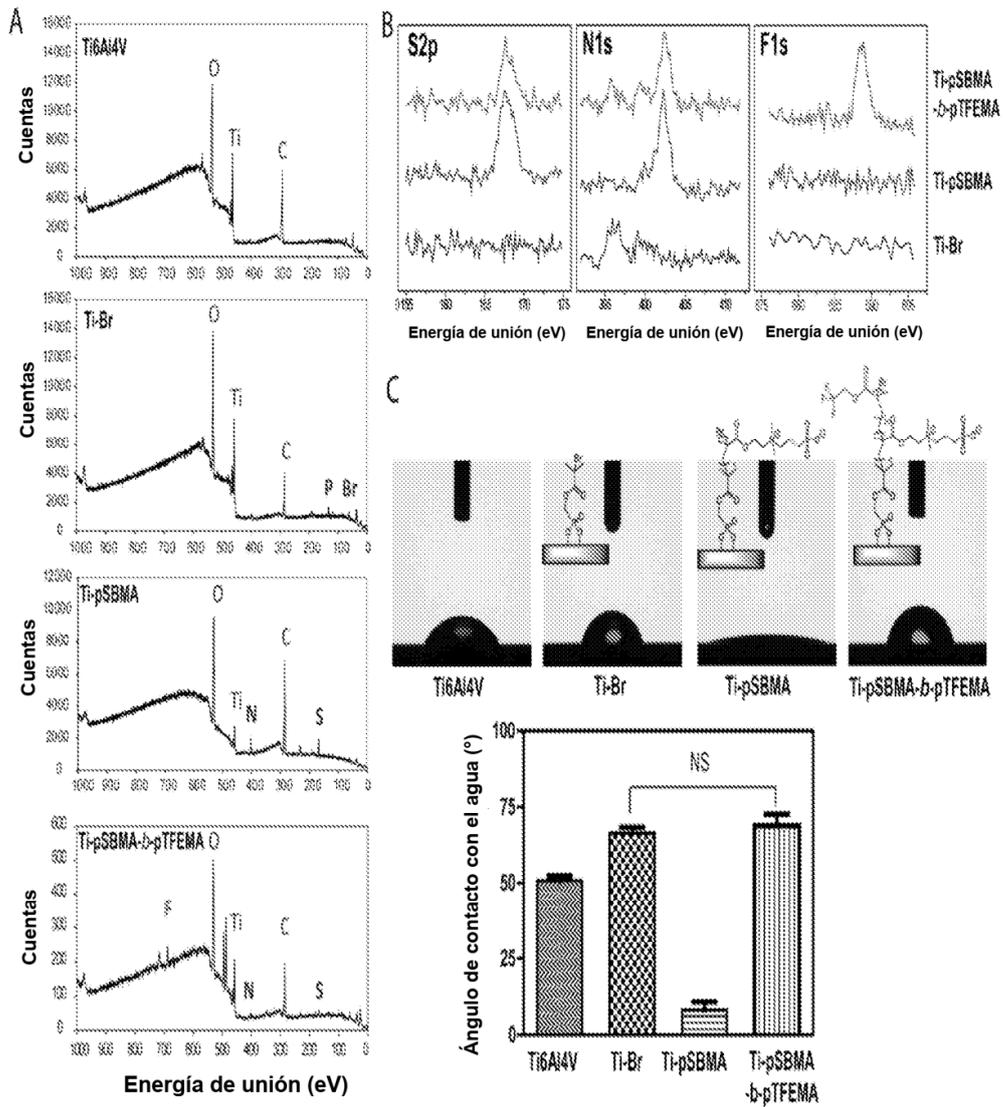


FIG. 8. (A) Escaneos prospectivos de XPS, (B) espectros de XPS de alta resolución y (C) mediciones de ángulo de contacto con el agua (N=3) que confirman la unión covalente del iniciador de superficie terminado en Br (Ti-Br) y el posterior injerto de cepillos de pSBMA₂₀₀ zwitteriónico (DP=200) y de copolímero de bloque pSBMA₅₀-b-pTFEMA₁₀₀ (DP=50 para pSBMA y DP=100 para pTFEMA) sobre los sustratos de Ti6Al4V mediante SI-ATRP. Todas las comparaciones por pares son significativas ($p < 0,05$, ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey) a menos que se indiquen como NS.

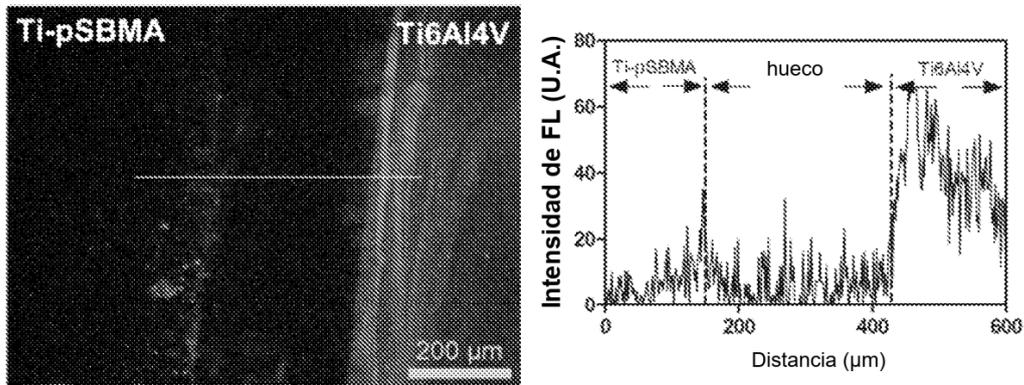


FIG. 9. Microscopía de fluorescencia (izquierda) y perfiles de línea de intensidad de fluorescencia (derecha) que muestran una absorción no específica sustancialmente reducida de BSA conjugado con fluoresceína sobre el sustrato de Ti6Al4V tras el injerto en la superficie de pSBMA₂₀₀ (DP=200) sobre el sustrato metálico. Las imágenes se tomaron después de incubar durante una noche con 500 μg/ml de conjugado de BSA-fluoresceína en PBS, seguido de aclarado con PBS.

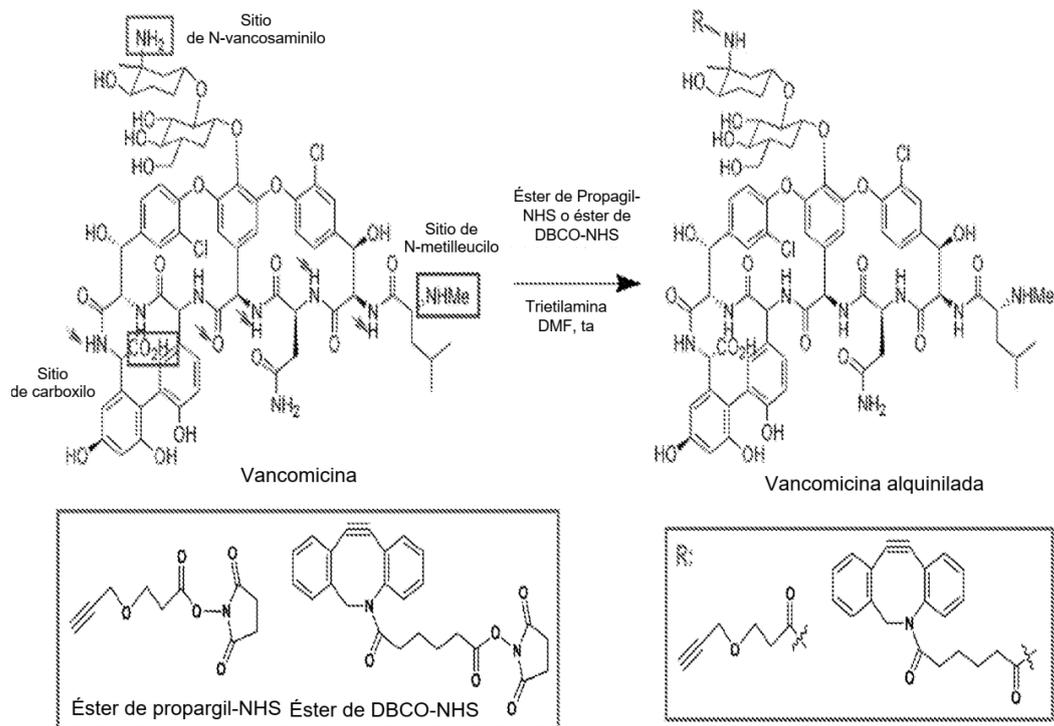
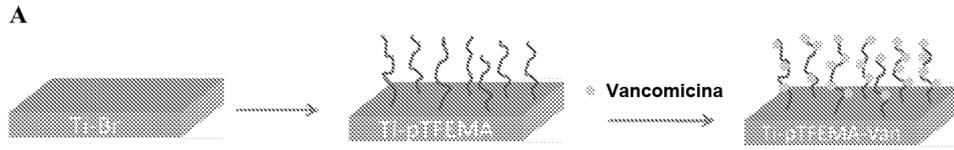
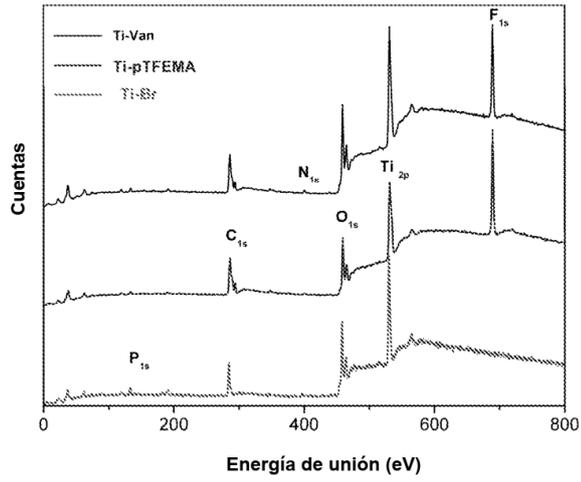


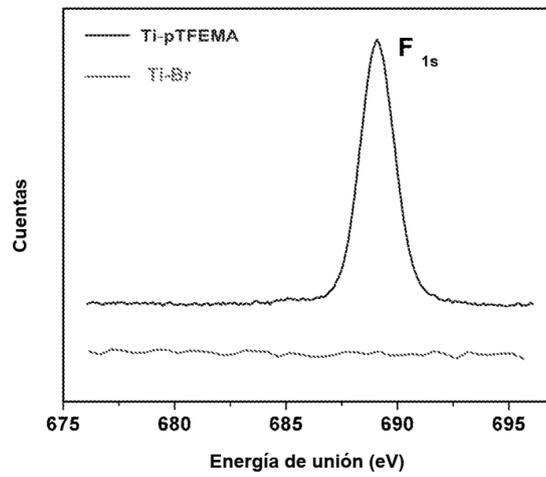
FIG. 10. Sitios de funcionalización potenciales de la vancomicina y estrategia sintética representativa propuesta para acoplar vancomicina alquilada en el sitio de N-vancosaminilo. Las flechas rojas indican los donantes/aceptores de enlace de H implicados en la unión a los extremos de L-Lys-D-Ala-D-Ala del peptidoglucano naciente. El grupo R también puede unirse a sitios de N-metilleucilo y carboxilo. Puede usarse una gran variedad de grupos R que contienen C=C bien como un grupo terminal o en una estructura cíclica restringida.



B



C



D

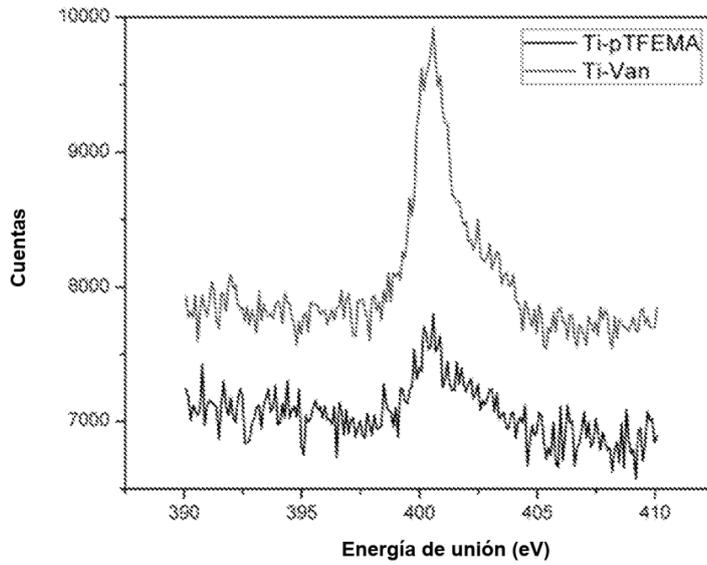


FIG. 11. (A) Conjugación de vancomicina a superficie de aleación de Ti con injerto de cepillo superficial de pTFEMA, (B) escaneos prospectivos de XPS, (C) escaneos de F_{1s} de alta resolución y (D) escaneos de N_{1s} de alta resolución de superficies de aleación de Ti de Ti-Br, injertadas con pTFEMA (Ti-pTFEMA) y funcionalizadas con vancomicina (Ti-Van).

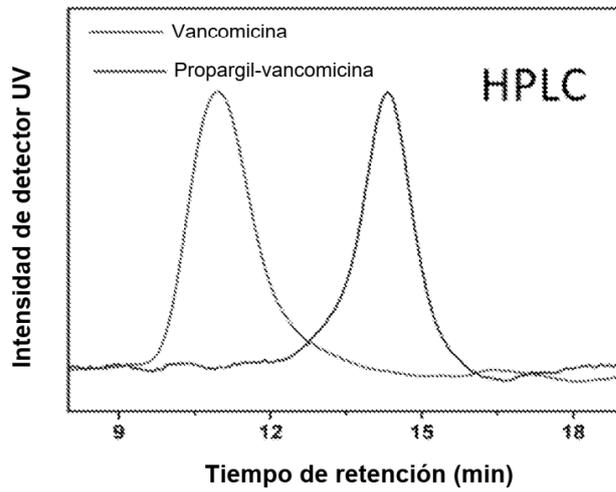
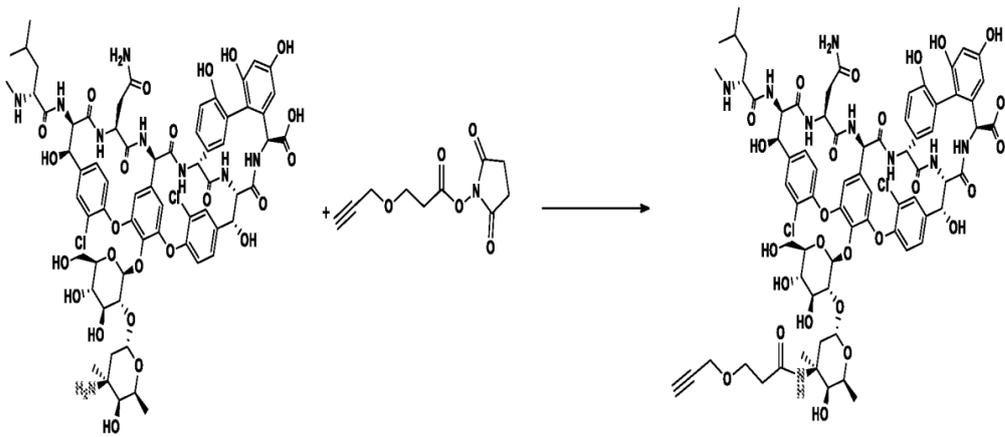
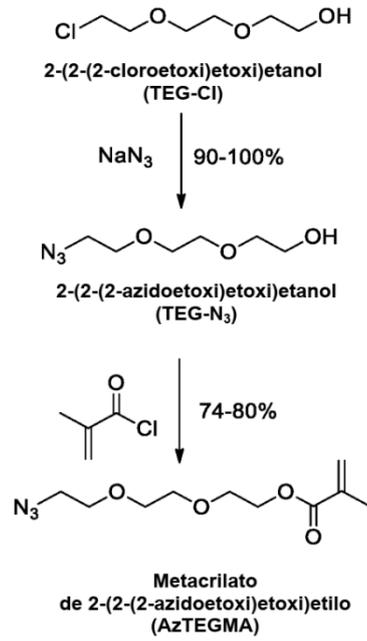
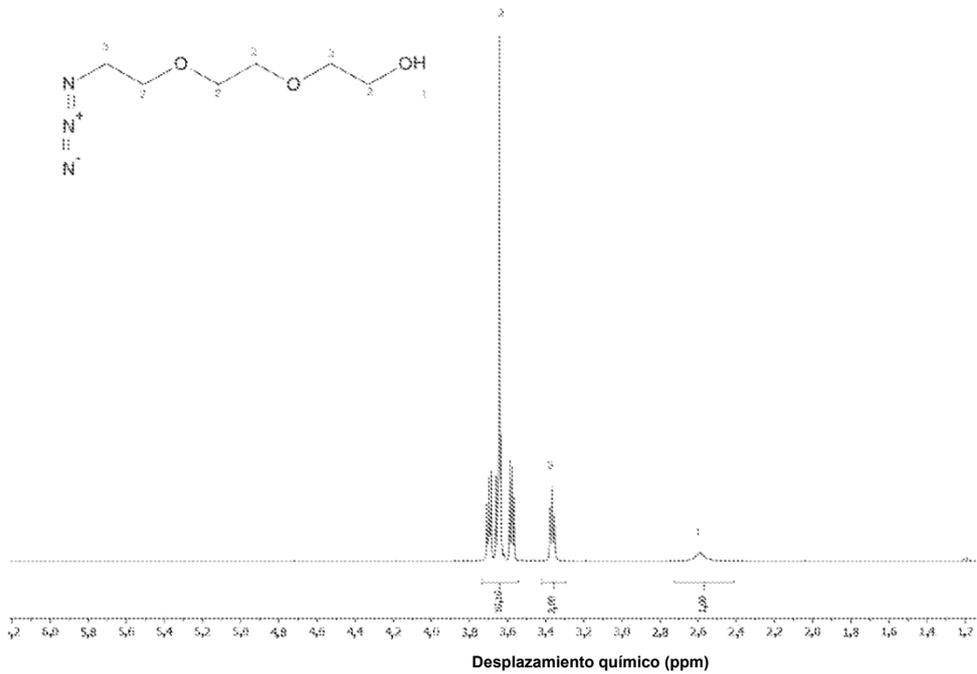


FIG. 12. Síntesis y caracterización por HPLC de fase reversa de vancomicina alquinilada.

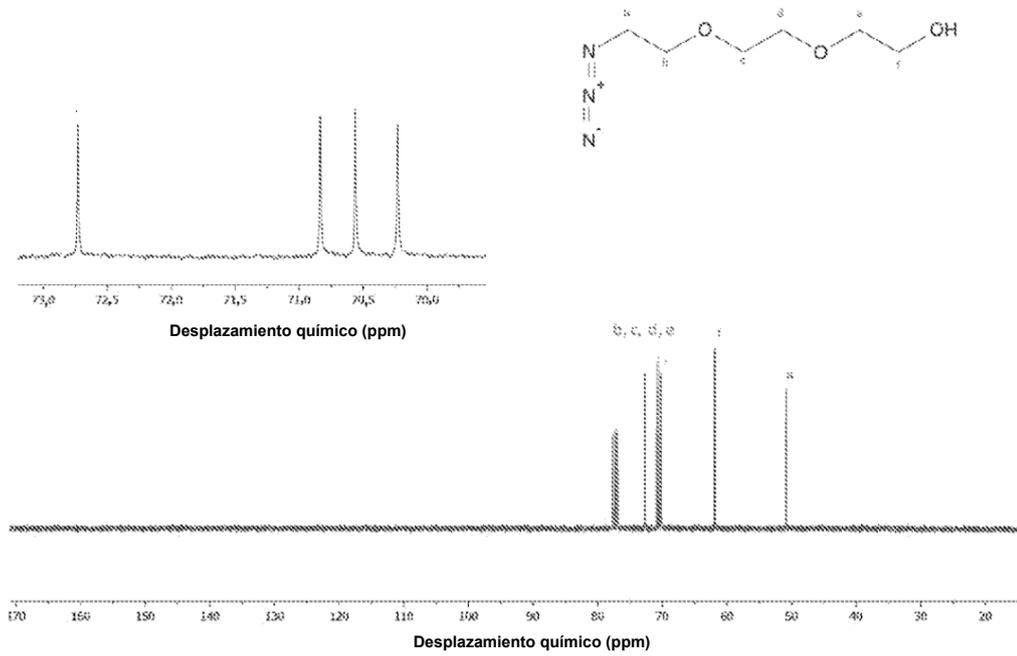
A.



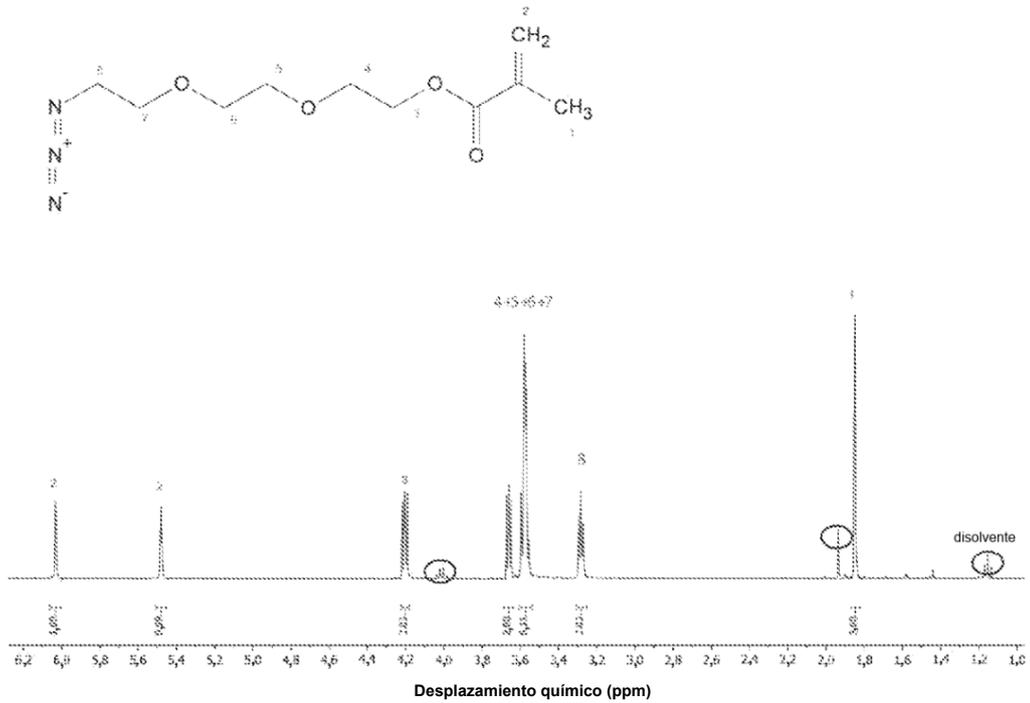
B.



C.



D.



E.

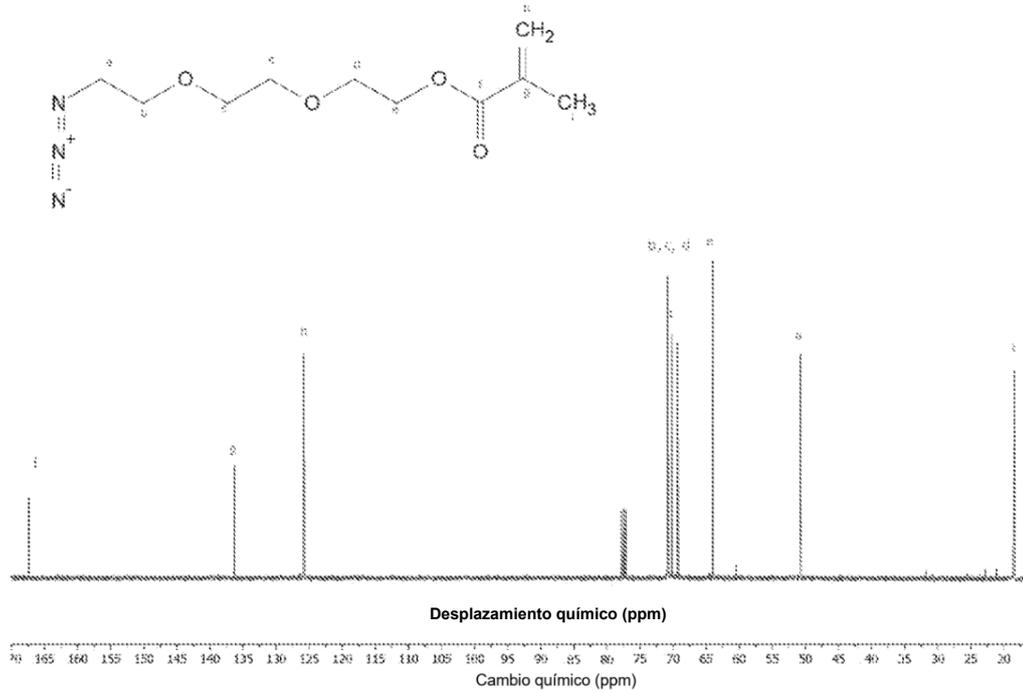
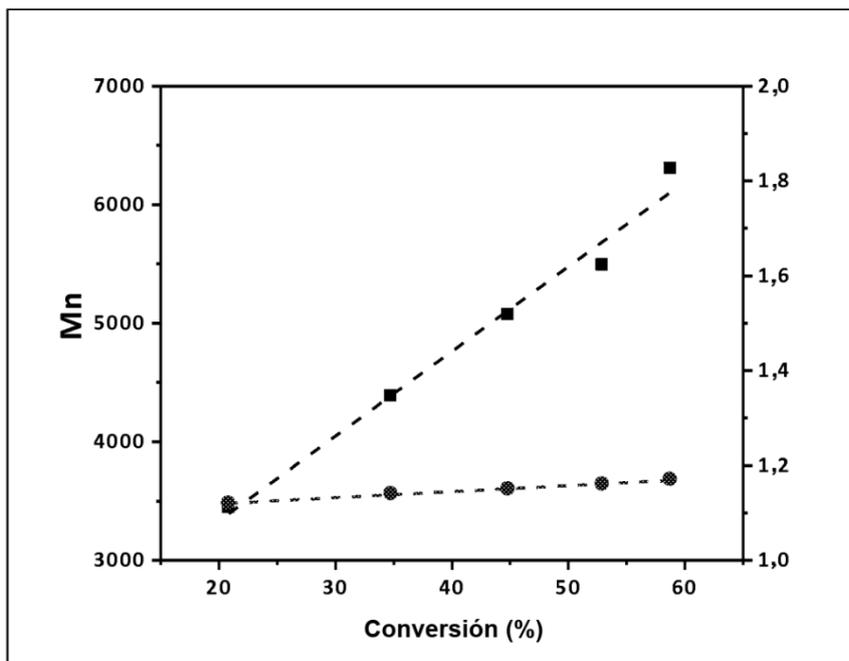
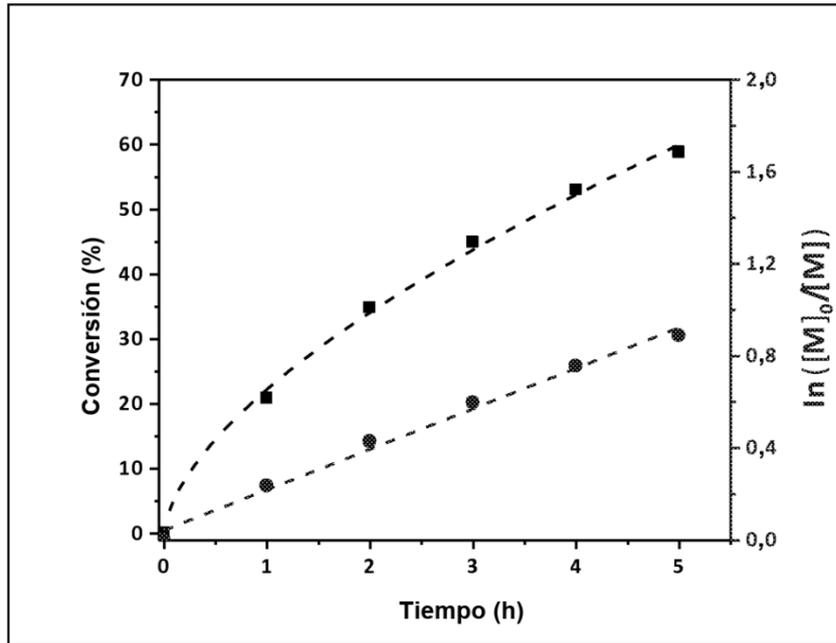


FIG. 13. Síntesis y caracterización de monómero que contiene azida. (A) esquema sintético; (B) y (C) RMN de ^1H y ^{13}C para TEG- N_3 ; (D) y (E) RMN de ^1H y ^{13}C para AzTEGMA.



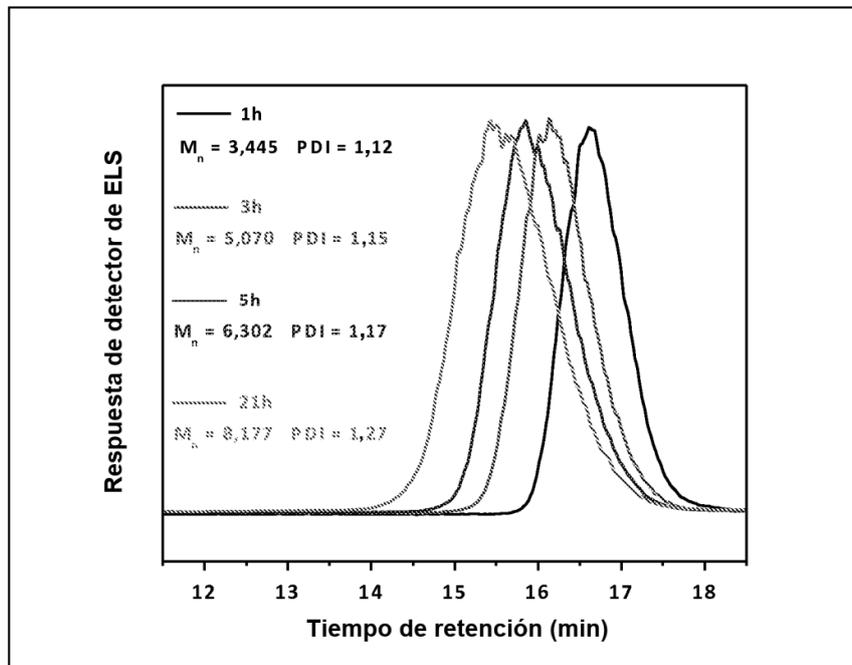
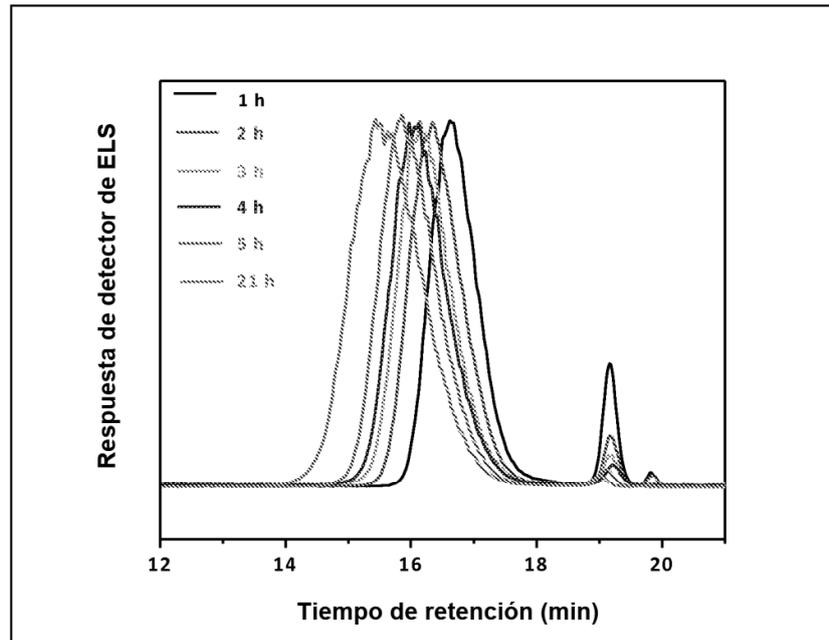


FIG. 14. Caracterización GPC de la cinética, la conversión y el índice de polidispersidad (PDI) de la solución de polimerización de AzTEGMA mediante ATRP.