

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 548**

51 Int. Cl.:

A01N 43/40 (2006.01)

A61L 31/10 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2023** **PCT/EP2023/087593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2024** **WO24133882**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2023** **E 23840685 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 4475678**

54 Título: **Un dispositivo médico que comprende un recubrimiento para mitigar la formación y/o el crecimiento de biopelículas**

30 Prioridad:

23.12.2022 SE 2251571

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

23.04.2025

73 Titular/es:

CYTACOAT AB (100.00%)
Maria Aspmans gata 44A
171 64 Solna, SE

72 Inventor/es:

WIRSÉN, PER;
RHODES, ALAN y
BROOKES, GRAEME

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 3 014 548 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

Un dispositivo médico que comprende un recubrimiento para mitigar la formación y/o el crecimiento de biopelículas

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un dispositivo médico para mitigar la formación y/o el crecimiento de biopelículas en una superficie. Más específicamente, la presente invención se refiere a un dispositivo médico que comprende un recubrimiento con 2-(piridilditio)etilamina (PDEA) o un compuesto estrechamente relacionado unido covalentemente a un polímero o unido no covalentemente al recubrimiento. La cantidad de PDEA unida covalentemente o no covalentemente en el recubrimiento puede ser baja y, sin embargo, permitir mitigar la formación y/o el crecimiento de biopelículas cuando el dispositivo médico se expone a microorganismos, tales como los microorganismos del cuerpo humano.

15 Antecedentes de la invención

Las biopelículas son agregados de microorganismos incrustados en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que se adhieren y crecen fácilmente en superficies, tales como superficies sólidas. Los microorganismos pueden ser de distintos tipos, tales como bacterias, arqueas, protozoos, hongos y algas. Se ha descubierto que la estructura de la biopelícula proporciona una barrera natural y una capa protectora para los microorganismos que les permite prosperar y los hace más resistentes al estrés medioambiental en comparación con los organismos planctónicos que no están conectados entre sí. Por lo tanto, la formación de biopelículas parece ser una forma de que los microorganismos sobrevivan a la exposición a tensiones externas, tales como la irradiación UV, temperaturas y pH extremos, productos químicos, desinfectantes, agentes antimicrobianos, etc. Sin embargo, la protección conferida a los microorganismos y la presencia generalizada de las biopelículas causan problemas en muchos sectores, incluyendo el de la atención médica, en donde se ha informado de que las biopelículas están implicadas en el 80% de las infecciones crónicas y en el 65% de otras infecciones.

Las biopelículas son motivo de especial preocupación debido a su capacidad para tolerar o resistir el tratamiento con antimicrobianos, tales como los antibióticos, lo que hace que las infecciones asociadas a la presencia de biopelículas sean difíciles o incluso imposibles de tratar. Se ha informado de que las dificultades para tratar con antibióticos las infecciones asociadas a biopelículas se deben, por ejemplo, a la escasa penetración de los antibióticos en la biopelícula, que también puede ir acompañada de una mala difusión dentro de la biopelícula, lo que da lugar a bajas concentraciones de los antibióticos, de modo que las bacterias pueden sobrevivir y desarrollar resistencia. Además, al incorporarse a la biopelícula, las bacterias cambian de forma que pasan de ser planctónicas a sésiles, es decir, pasan de ser bacterias de vida libre a crecer de forma adherente, con lo que su actividad metabólica disminuye, lo que las hace menos sensibles a los antibióticos. Como resultado, para algunos antibióticos la concentración necesaria para matar las bacterias incrustadas en una biopelícula puede ser hasta mil veces superior a la concentración necesaria para matar las bacterias planctónicas.

Por lo tanto, la formación de biopelículas es una causa importante de resistencia a los antibióticos. Dado que los antibióticos son una de las herramientas más esenciales para el tratamiento de las infecciones y enfermedades bacterianas, esto supone una reducción de la capacidad para tratar adecuadamente a los pacientes, lo que conlleva un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Lamentablemente, la resistencia a los antimicrobianos ha ido en aumento durante muchos años y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la reconoce como uno de los diez principales retos sanitarios mundiales.

La formación y el crecimiento de biopelículas se producen con frecuencia en las superficies de los dispositivos médicos utilizados en la medicina moderna. Las biopelículas pueden formarse tanto en dispositivos médicos intermitentes como permanentes, tales como implantes, catéteres y similares. Por ejemplo, las infecciones del tracto urinario asociadas al catéter, denominadas CAUTI, son una de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria más comunes que afecta a un gran número de pacientes hospitalizados que tienen un catéter urinario. Dado el amplio uso de productos sanitarios, esto supone un gran problema para el sector sanitario, tanto en términos de sufrimiento humano como de presión económica. Por ello, las medidas para prevenir la formación y el crecimiento de biopelículas han suscitado un interés y un esfuerzo considerables.

Durante los últimos años se ha desarrollado un gran número de materiales de recubrimiento para alterar la superficie con el fin de minimizar la adherencia de bacterias y biopelículas. Por ejemplo, se han incluido en los recubrimientos antimicrobianos como pequeñas moléculas, iones de plata y nanopartículas.

WO 2006/101438 divulga un agente antimicrobiano que comprende un compuesto de cisteína unido covalentemente a un sustrato, en particular, mediante la unión a través de una molécula espaciadora S-S al sustrato. Se describe que el agente tiene excelentes propiedades antimicrobianas y puede utilizarse para recubrir superficies o sustratos de diversos dispositivos, tales como los dispositivos médicos, con el fin de mitigar la acumulación y/o el crecimiento y/o la proliferación y/o la viabilidad de los microorganismos y/o la formación de biopelículas. En el Ejemplo 16 se afirma que la presencia del componente cys es esencial para el efecto

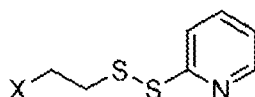
antibacteriano. Odeberg et al. (A novel cysteine-linked antibacterial surface coating significantly inhibits bacterial colonization of nasal silicone prongs in a phase one pre-clinical trial. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2018 Dec 1;93:782-789) divulgan un ensayo de fase 1 en humanos de cánulas nasales recubiertas con un compuesto de cisteína fabricadas con el método divulgado en WO 2006/101438.

Li et al (Bioconjugate Chemistry, vol. 7, no. 5, 1 Enero 1996, páginas 592-599) divulga un recubrimiento que comprende un copolímero tribloque de óxido de polietileno-óxido de polipropileno (poloxámeros/plurónico) modificado con grupos carboxílicos en los extremos y funcionalizado con clorhidrato de 2-(2-piridilditio)etilamina. US 5.436.161 divulga un recubrimiento de matriz adecuado para un dispositivo médico que comprende un polímero (hidrogel) con grupos carboxílicos y el derivado reactivo que es el producto de una reacción entre un éster reactivo y 2-(2-piridinilditio) etanamina.

Aunque muchos recubrimientos han demostrado su eficacia, sigue existiendo la necesidad de recubrimientos mejorados, tales como los que impiden la formación y/o el crecimiento de biopelículas tras la exposición a microorganismos durante varios días o más. Es objeto de la presente invención superar o al menos mitigar algunos de los problemas asociados a los recubrimientos conocidos. Además, es un objeto de la presente invención proporcionar aspectos y/o ventajas no proporcionados por la técnica conocida hasta ahora.

Breve descripción de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que un recubrimiento que comprende un polímero con grupos carboxilo libres junto con una concentración en cantidad de restos de la Fórmula A



Fórmula A

proporciona un efecto antibiopelícula no descubierto hasta ahora. El efecto novedoso no se basa en la inhibición del crecimiento de microorganismos en el recubrimiento, sino que impide la formación de una biopelícula en la superficie recubierta, lo que resulta ventajoso sobre todo desde el punto de vista regulatorio (véase el Ejemplo 8). La preparación y caracterización del recubrimiento se muestra en los Ejemplos 1-3. El Ejemplo 4 demuestra que la superficie recubierta no es citotóxica. La cantidad de Fórmula A de acuerdo con la invención es significativamente menor que en la tecnología anterior, como se muestra en el Ejemplo 5 y en el Ejemplo de referencia 6. La dosis-respuesta de la actividad antibiopelícula (frente a la inhibición del crecimiento) se demuestra además en el Ejemplo 7.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas se establecen en las reivindicaciones dependientes.

La disposición de la presente divulgación en secciones con títulos y subtítulos es meramente para mejorar la legibilidad y no debe interpretarse como limitativa en modo alguno, en particular, la división no excluye ni limita en modo alguno la combinación de características bajo diferentes títulos y subtítulos entre sí.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la densidad óptica (OD) medida a una longitud de onda de 595 nm para tres muestras de catéter como se describe en el Ejemplo 2. La OD está correlacionada con la matriz de EPS y el número de bacterias incrustadas, lo que indica que el recubrimiento inventivo produce una inhibición casi completa de la formación de biopelículas.

La **Figura 2** muestra la cantidad acumulada de 2-mercaptopiridina medida y, por lo tanto, la cantidad de PDEA en el recubrimiento medida en el Ejemplo 5.

La **Figura 3** muestra la cantidad acumulada de 2-mercaptopiridina medida y, por lo tanto, la cantidad de PDEA en el recubrimiento medida en el Ejemplo de referencia 6.

La **Figura 4** es una vista ampliada del ciclo 2 y siguientes, como se muestra en la Figura 3, utilizando el ciclo 1 como valor inicial. Esto indica la cantidad de PDEA que queda en el producto de la generación anterior tras el acoplamiento con el componente de cisteína (que corresponde a la situación tras 1 ciclo de acoplamiento).

La **Figura 5** muestra el recuento de bacterias adheridas presentes en la superficie de la muestra expresado en log UFC/cm². Se puede observar que, a bajas concentraciones, no hay ningún efecto sobre el número de bacterias.

La **Figura 6** muestra el recuento de bacterias en el medio de orina artificial (AUM) expresado en log UFC/ml. Se puede observar que, a bajas concentraciones, no hay ningún efecto sobre el número de bacterias.

La **Figura 7** muestra el recuento de bacterias en el medio de orina artificial (AUM) y en la superficie del catéter expresado en log UFC/ml. Se puede observar que el recubrimiento no tiene ningún efecto sobre el recuento de bacterias en disolución, lo que demuestra que no existe ningún efecto bactericida o bacteriostático (CytaCoat denota el recubrimiento de la presente invención)

La **Figura 8** muestra la cuantificación de la biopelícula en la superficie del catéter. El recubrimiento inventivo (denominado "CytaCoat") impide casi por completo la formación de biopelículas durante la semana 1 (panel derecho). Cuando las bacterias de la semana 1 entran en contacto con los catéteres de control, siguen siendo capaces de formar una biopelícula durante la semana 2 (panel izquierdo), lo que demuestra que la exposición a la superficie inventiva no había modificado sus propiedades.

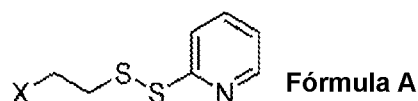
La **Figura 9** ilustra la configuración experimental del Ejemplo 8.

Descripción

Dispositivo médico que comprende un recubrimiento

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo médico que comprende un recubrimiento, en donde dicho recubrimiento comprende:

polímero Z unido al dispositivo médico (preferiblemente unido covalentemente) y restos de la Fórmula A



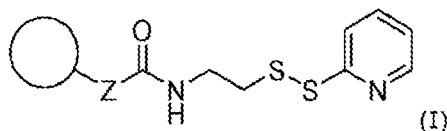
en donde X es un grupo amino unido covalentemente a Z o que puede unirse iónicamente a grupos carboxilo libres; en donde los restos de acuerdo con la Fórmula A están presentes en el recubrimiento en una cantidad de aproximadamente 0,5-30 nmol/cm²; y en donde el polímero Z comprende grupos carboxilo libres en una cantidad de aproximadamente 1-30 μmol/cm².

La presente invención también puede referirse a un dispositivo médico que comprende un recubrimiento, en donde dicho recubrimiento comprende el polímero Z unido al dispositivo médico (preferiblemente unido covalentemente), y un compuesto disulfuro de Fórmula (I) como se define en WO2023/012305, asociado covalentemente o no covalentemente con el polímero, en donde el polímero Z comprende preferiblemente grupos carboxilo libres en una cantidad de aproximadamente 1-30 μmol/cm². Los compuestos de disulfuro divulgados en la reivindicación 10, 11 o 12 de WO2023/012305 son particularmente preferidos. El recubrimiento puede comprender agua, formando así un hidrogel.

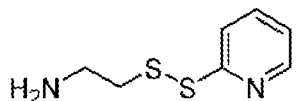
X puede ser un grupo amino primario -NH₂, un grupo amino secundario -NRH, o un grupo amino terciario -NR₂, en donde cada R se selecciona independientemente de alquilo de C₁₋₄. Los ejemplos de alquilo de C₁₋₄ incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo. En algunas realizaciones, X es un grupo amino primario -NH₂.

X puede estar unido covalentemente a Z en grupos funcionales terminales y/o a grupos funcionales a lo largo de la cadena principal del polímero. Ejemplos de tales grupos funcionales incluyen el carboxi. Alternativamente, X puede unirse iónicamente a grupos libres terminales o a grupos libres a lo largo de la cadena principal del polímero (por ejemplo, grupos carboxilo). Por ejemplo, cuando X es un grupo amino primario -NH₂, y el polímero comprende grupos -COOH, dichos grupos llevan cargas opuestas (-NH₃⁺, -COO⁻) en un amplio rango de valores de pH alrededor del neutro, y en consecuencia pueden asociarse iónicamente. Del mismo modo, un grupo amino secundario -NRH puede unirse iónicamente a -COO⁻ en su forma protonada -NRH₂⁺, y un grupo amino terciario -NR₂ puede unirse iónicamente a -COO⁻ en su forma protonada -NRH₂⁺.

El recubrimiento puede comprender la estructura de la Fórmula I:



en donde el círculo representa la superficie del dispositivo médico. El recubrimiento puede comprender, adicional o alternativamente, restos de la Fórmula A en donde X es un grupo amino, tal como se ha definido anteriormente. En algunas realizaciones, el recubrimiento comprende la estructura:



Al menos aproximadamente 1 %mol de los restos de acuerdo con la Fórmula A pueden estar unidos a Z mediante un enlace covalente, o en un orden creciente de preferencia: al menos aproximadamente 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50,

60, 70, 80, 90 o 100 %mol, tal como 2-100, 5-100, 10-100, 30-100, 50-100, 80-100, 2-90, 5-90, 10-90, 20-90, 30-90, 50-90, 80-90, 2-70, 5-70, 10-70, 30-70, 50-70, 20-80, 30-90, 40-80 %mol. Al menos 1 %mol de los restos de acuerdo con la Fórmula A pueden estar asociados iónicamente con el recubrimiento, o en un orden creciente de preferencia: al menos aproximadamente 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 %mol, tal como 2-100, 5-100, 10-100, 30-100, 50-100, 80-100, 2-90, 5-90, 10-90, 20-90, 30-90, 50-90, 80-90, 2-70, 5-70, 10-70, 30-70, 50-70, 20-80, 30-90, 40-80 %mol. Para ser claros, es posible que estén presentes al mismo tiempo tanto restos unidos covalentemente como restos asociados iónicamente.

Los restos de acuerdo con la Fórmula A pueden estar presentes en una cantidad de aproximadamente 0,5-15 nmol/cm² en el recubrimiento. En ciertas realizaciones, las moléculas de acuerdo con la Fórmula A pueden estar presentes en una cantidad de aproximadamente 0,5-12 nmol/cm², aproximadamente 0,5-10 nmol/cm², aproximadamente 0,5-9 nmol/cm², aproximadamente 0,5-8 nmol/cm², aproximadamente 0,5-7 nmol/cm², aproximadamente 0,5-6 nmol/cm², aproximadamente 0,5-5 nmol/cm², aproximadamente 0,5-4 nmol/cm², aproximadamente 0,5-3 nmol/cm², aproximadamente 0,5-2 nmol/cm², aproximadamente 0,5-1 nmol/cm², aproximadamente 1-12 nmol/cm², aproximadamente 1-10 nmol/cm², aproximadamente 1-9 nmol/cm², aproximadamente 1-8 nmol/cm², aproximadamente 1-7 nmol/cm², aproximadamente 1-6 nmol/cm², aproximadamente 1-5 nmol/cm², aproximadamente 1-4 nmol/cm², aproximadamente 1-3 nmol/cm², aproximadamente 1-2 nmol/cm², o aproximadamente 1 nmol/cm².

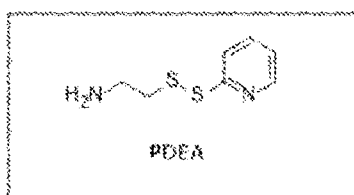
El polímero Z puede comprender preferiblemente grupos carboxilo libres en una cantidad de al menos 3 µmol/cm², tal como, por ejemplo, de aproximadamente 3-20 µmol/cm². En ciertas realizaciones, la concentración superficial de los grupos de ácido carboxílico puede ser de aproximadamente 1-20 µmol/cm², aproximadamente 1-15 µmol/cm², aproximadamente 1-10 µmol/cm², aproximadamente 1-7 µmol/cm² o aproximadamente 1-5 µmol/cm². La concentración superficial de los grupos de ácido carboxílico de aproximadamente 3-7 µmol/cm² es la más preferida.

En un conjunto de realizaciones alternativas del primer aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo médico que comprende un recubrimiento tal como se define en el primer aspecto, en donde dicho recubrimiento comprende

2-(piridilditio)etilamina (PDEA) unida covalentemente a un polímero, en donde dicho polímero está unido covalentemente al dispositivo médico en donde la PDEA está presente en una cantidad del 0,001% en peso al 35% en peso con base en el peso total del recubrimiento.

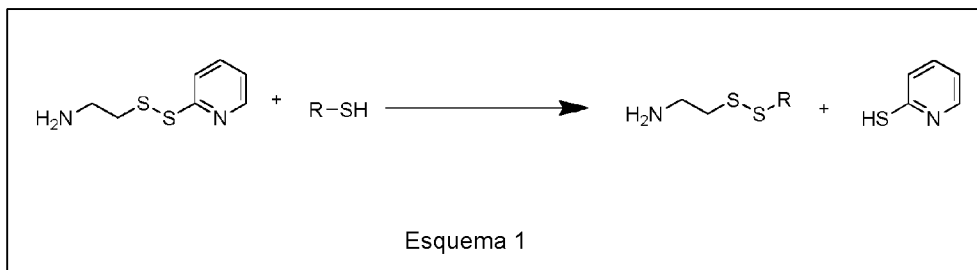
La PDEA puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 35% en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 30% en peso, de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 25% en peso, de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 20% en peso, de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 15% en peso, de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 10% en peso, de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 5% en peso, de 0,001% en peso a aproximadamente 3% en peso, de 0,001% en peso a aproximadamente 2% en peso, de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 1% en peso, de 0,001% en peso a aproximadamente 0,5% en peso con base en el peso total del recubrimiento. Por ejemplo, el PDEA puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 2% en peso o de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 1% en peso con base en el peso total del recubrimiento. En otro ejemplo, la cantidad de PDEA puede ser de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 2% en peso, como por ejemplo de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 1,5 % en peso, con base en el peso total del recubrimiento. En otro ejemplo, la cantidad de PDEA puede ser de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 1% en peso, de 0,01% en peso a 1% en peso, de 0,05% en peso a 1% en peso, de 0,08% en peso a 1% en peso o de 0,1% en peso a 1% en peso con base en el peso total del recubrimiento.

Se entenderá que el compuesto 2-(piridilditio)etilamina puede abreviarse como PDEA. Además, la estructura química de la 2-(piridilditio)etilamina (PDEA) puede representarse como se muestra a continuación. En este documento, el nombre químico de la 2-(piridilditio)etilamina puede utilizarse indistintamente con 2-(piridin-2-il)disulfanamina, 2-(piridin-2-ildisulfanil)etanamina, 2-(2-piridilditio)etilamina y/o PDEA.

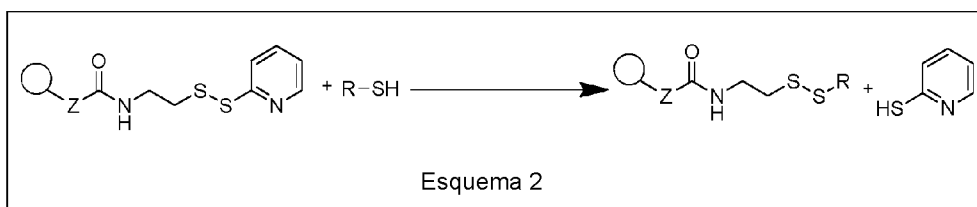


En ciertos contextos en la presente, el término "PDEA" también puede utilizarse de forma más general para

referirse a una estructura química que comprende un resto de acuerdo con la Fórmula A. Se sabe que la PDEA reacciona con nucleófilos que contienen tiol, como la cisteína, por lo que el enlace disulfuro de PDEA se rompe cuando el azufre unido al anillo de piridina de PDEA se sustituye por el azufre del grupo tiol del nucleófilo. Como resultado, se forma un compuesto que incluye $-S-(CH_2)_2-NH_2$ de la PDEA, así como piridina-2-tiol. Esto se ilustra en el Esquema 1 a continuación, en donde el nucleófilo R-SH se hace reaccionar con PDEA.



Del mismo modo, la reacción de un nucleófilo que contiene tiol con PDEA se ha utilizado, por ejemplo, en aplicaciones en donde el grupo amino de PDEA está unido covalentemente a un grupo carbonilo de un polímero que, a su vez, está unido, por ejemplo, covalentemente a la superficie de un sustrato, tal como un dispositivo médico. Esto se ilustra en el Esquema 2, en donde el círculo representa una superficie, tal como la de un dispositivo médico, Z representa un polímero y el grupo carbonilo forma parte del polímero.



Por ejemplo, WO 2006/101438 A1 describe una reacción de este tipo utilizando cisteína o análogos de la cisteína como nucleófilos que contienen tiol, lo que da lugar a superficies con excelentes propiedades antimicrobianas.

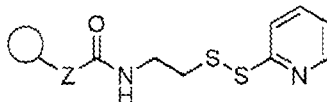
Prevención o mitigación de la biopelícula

En el presente contexto, el término **biopelícula** se refiere a una estructura tridimensional compleja sobre una superficie (tal como un dispositivo médico) formada por comunidades de microorganismos (bacterias, hongos o protistas) que están incrustados en sustancias poliméricas extracelulares (EPS) autoproducidas. La formación de una biopelícula protege a los microorganismos y dificulta su erradicación y puede influir significativamente en la patogenicidad de los microbios. La formación de biopelículas es un proceso de varios pasos que implica la adhesión, la producción de EPS y la maduración de la biopelícula.

Los términos **prevención** y **mitigación** en el contexto de la formación o/y crecimiento de biopelículas se refieren a cualquier grado de reducción en la formación de una biopelícula, incluyendo una reducción menor, sustancial o mayor en la formación de una biopelícula, así como la prevención total. Preferiblemente, el grado de reducción es al menos una reducción menor. El grado de reducción puede ser de al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o aproximadamente 100%. Por ejemplo, el grado de reducción puede estar comprendido entre aproximadamente 10% y aproximadamente 100%, tal como entre aproximadamente 20% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 60%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 80%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 40% y aproximadamente 60%, entre aproximadamente 40% y aproximadamente 80%, entre aproximadamente 40% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 80%, entre aproximadamente 60% y aproximadamente 100%, o entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100%. Un "efecto antibiopelícula" se refiere a la mitigación de la formación y/o crecimiento de biopelícula.

La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que la mitigación de la formación y/o el crecimiento de la biopelícula en superficies como las de los dispositivos médicos puede lograrse mediante la unión covalente de la PDEA u otro resto de acuerdo con la Fórmula A a un polímero que a su vez está unido, tal como unido covalentemente, a una superficie de un dispositivo médico. Alternativamente, la PDEA u otro compuesto que contenga un resto de acuerdo con la Fórmula A puede asociarse no covalentemente (tal como iónicamente) con el

polímero. Por lo tanto, no se requiere ninguna reacción de PDEA o del resto de acuerdo con la Fórmula A con otro compuesto químico para lograr la mitigación de la formación y/o el crecimiento de la biopelícula. Una posible estructura química de la superficie así funcionalizada se muestra mediante la Fórmula I, en donde el círculo y Z tienen los significados descritos en la presente y el grupo carbonilo forma parte del polímero.



Fórmula 1

En particular, se ha descubierto que la cantidad del resto de la Fórmula A puede ser baja, tal como la proporcionada en una cantidad como la descrita en la presente, y aun así permitir la mitigación de la formación y/o el crecimiento de la biopelícula en la superficie de un dispositivo médico. En cantidades bajas, el recubrimiento no tiene efecto bacteriostático ni bactericida, pero el efecto antibiopelícula evita la formación de incrustaciones en el dispositivo médico.

Por supuesto, el uso de PDEA u otra estructura que comprenda la Fórmula A como el único agente antibiopelícula y en una cantidad baja es una ventaja significativa, ya que simplifica la fabricación y/o minimiza el uso de productos químicos. Además, el uso de una cantidad baja de estructura de acuerdo con la Fórmula A unida covalentemente o no covalentemente al polímero minimiza el riesgo de toxicidad. Como se muestra en la presente, las pruebas del recubrimiento no han mostrado citotoxicidad. Por lo tanto, no hay liberación o hay una liberación mínima de PDEA (u otro compuesto que comprenda la estructura de acuerdo con la Fórmula A) en una cantidad que proporcione un efecto terapéutico. Esto, a su vez, simplifica los procesos de regulación de los productos sanitarios con el recubrimiento.

Se apreciará que la biopelícula comprende microorganismos, tales como bacterias. Las bacterias pueden ser Gram-positivas y/o Gram-negativas. Por ejemplo, puede tratarse de una o varias de las siguientes bacterias: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cinetobacter baumannii*. En un ejemplo, las bacterias Gram-positivas pueden ser una o más de las siguientes: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus spp.* En otro ejemplo, las bacterias Gram negativas pueden ser una o varias de las siguientes: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Adicional o alternativamente, la biopelícula puede comprender hongos, tal como *Candida Albicans*.

Se entenderá que la mitigación de la formación y/o el crecimiento de la biopelícula descrita en la presente puede implicar minimizar, reducir y/o prevenir la formación y/o el crecimiento de la biopelícula. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que algunas bacterias pueden seguir adhiriéndose a la superficie pero sin agruparse en biopelículas, lo que las hace susceptibles al tratamiento con agentes antimicrobianos, tales como los antibióticos, o simplemente les permite ser lavadas o enjuagadas. También se sabe que los microorganismos sin biopelícula/EPS tienen menos probabilidades de causar infecciones (es decir, son menos agresivos como patógenos). La falta de biopelícula también los hace más susceptibles al sistema inmunológico del organismo, así como más accesibles a la terapia con fármacos.

Polímeros del recubrimiento

El polímero (opcionalmente unido covalentemente al resto de la Fórmula A) proporciona un recubrimiento a la superficie. En presencia de agua, el recubrimiento puede formar un hidrogel. Por lo tanto, se proporciona un recubrimiento como el descrito en la presente que comprende o consiste en un hidrogel. Tal como se utiliza en la presente, un hidrogel es un polímero hidrófilo reticulado que no se disuelve en agua.

Se entenderá que el polímero del recubrimiento puede estar unido, por ejemplo, covalentemente, a la superficie del dispositivo médico. Se cree que esto permite que el recubrimiento permanezca en su sitio y aumenta su resistencia a desgastarse. Ventajosamente, se ha comprobado que el dispositivo médico recubierto de la presente invención es resistente a la abrasión.

La funcionalización de la superficie del dispositivo médico implica la polimerización de los monómeros antes de la reacción con la PDEA u otro compuesto que comprenda la estructura de la Fórmula A. Los monómeros pueden comprender uno o más grupos funcionales como grupos carboxilo, grupos amino, halógenos, etc.

Los monómeros pueden seleccionarse del grupo que consiste en ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido 4-vinilbenzoico, ácido itacónico, vinilpirrolidona, cualquier combinación o combinaciones de los anteriores y ésteres o amidas de los mismos. Por ejemplo, los monómeros pueden comprender o consistir en monómeros de acrilato o acrílicos, tales como el ácido acrílico. En consecuencia, el polímero del recubrimiento puede ser o comprender

ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido poli-4-vinilbenzoico, ácido poliitacónico, cualquier combinación de los anteriores y ésteres o amidas de los mismos. El recubrimiento puede comprender además polivinilpirrolidona. En particular, el polímero puede comprender un polímero de acrilato o un polímero acrílico, tal como el ácido poliacrílico. Por ejemplo, el polímero puede comprender o consistir en ácido poliacrílico. Se entenderá que para los polímeros que comprenden grupos de ácido carboxílico la concentración superficial del ácido carboxílico puede estar en el rango de aproximadamente $1 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $30 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, tal como de aproximadamente $5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $25 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, de aproximadamente $5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $20 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, de aproximadamente $5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $10 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, de aproximadamente $6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $9 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$. Por ejemplo, la concentración superficial del ácido carboxílico puede estar en el rango de aproximadamente $3 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $8 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, de aproximadamente $4 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $7 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ o de aproximadamente $5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$. En ciertas realizaciones, la concentración superficial de los grupos de ácido carboxílico puede ser de aproximadamente $1\text{-}20 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, aproximadamente $1\text{-}15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, aproximadamente $1\text{-}10 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, aproximadamente $1\text{-}7 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ o aproximadamente $1\text{-}5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$. La concentración superficial de los grupos de ácido carboxílico de aproximadamente $3\text{-}7 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ es la más preferida.

El polímero del recubrimiento puede injertarse a partir del dispositivo médico. De este modo, la polimerización se iniciará y propagará desde la superficie a la que se unirán covalentemente los polímeros resultantes. Adicional o alternativamente, el polímero puede injertarse en la superficie del dispositivo médico, por lo que un polímero preformado se une covalentemente a la superficie.

Dispositivos médicos adecuados

El dispositivo médico descrito en la presente puede seleccionarse del grupo que consiste en un catéter, un implante, un tubo traqueal, un stent, un ventilador, apósitos para heridas, una mascarilla facial, una cánula nasal, un audífono y una jeringa. En otro ejemplo, el dispositivo médico puede seleccionarse del grupo formado por un catéter venoso central, una endoprótesis ureteral, apósitos para heridas, un respirador, una mascarilla facial, una cánula nasal y un implante. En otro ejemplo, el dispositivo médico puede ser un catéter, tal como un catéter de Foley, o un tubo endotraqueal.

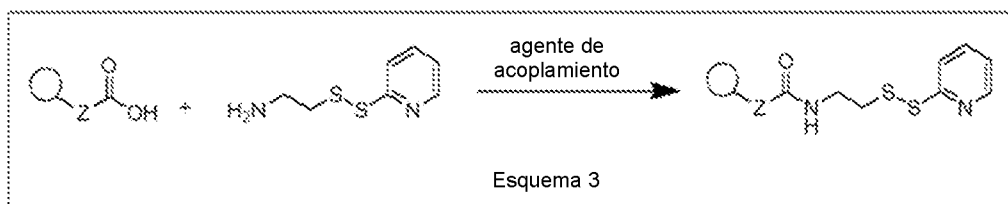
El dispositivo médico descrito en la presente puede comprender o consistir en un polímero, tal como un polímero termoplástico y/o termoestable. Por ejemplo, el polímero puede comprender o consistir en uno o más de los siguientes: silicona, polietileno, polipropileno (PP), poliuretano, cloruro de polivinilo (PVC), policaprolactona, policarbonato, caucho, tal como caucho de látex, poliéter éter cetona (PEEK). En un ejemplo, el polímero puede comprender uno o más de los siguientes: silicona, cloruro de polivinilo (PVC), polipropileno (PP). En otro ejemplo, el polímero puede comprender o consistir en silicona. En otro ejemplo más, el polímero puede comprender o consistir en cloruro de polivinilo (PVC). En otro ejemplo, el polímero puede comprender o consistir en polipropileno (PP).

Adicional o alternativamente, el dispositivo médico puede comprender o consistir en un metal. Por ejemplo, el metal puede comprender uno o más de los siguientes: acero, tal como acero inoxidable, aleación, tal como aleación a base de cobalto o nitinol, o titanio. Tal como se utiliza en la presente, el nitinol es una aleación que comprende o está formada por níquel y titanio.

El recubrimiento del dispositivo médico puede estar presente en al menos parte de una superficie interior y/o exterior del dispositivo médico.

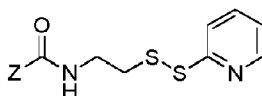
Por ejemplo, se ha comprobado que la superficie del dispositivo médico descrito en la presente puede estar libre o sustancialmente libre de biopelícula tras 4 días o más de uso clínico. Por ejemplo, el dispositivo médico puede estar libre de biopelícula tras 7, 14, 21 o 30 días de uso clínico.

El recubrimiento puede aplicarse sobre el dispositivo médico mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método como el descrito en WO 2006/101438 A1 puede utilizarse para preparar el dispositivo médico recubierto descrito en la presente. Sin embargo, se entenderá que la PDEA unida u otra estructura que comprenda la estructura de la Fórmula A preferiblemente no se hará reaccionar adicionalmente. Por ejemplo, la superficie del dispositivo médico puede funcionalizarse polimerizando monómeros, tales como los descritos en la presente de la superficie del dispositivo en presencia de un fotoiniciador mediante irradiación, tales como irradiación con haz de electrones, irradiación gamma, irradiación UV o plasma gaseoso; posteriormente, el polímero formado puede hacerse reaccionar además con PDEA u otro resto de Fórmula A en presencia de un agente de acoplamiento, tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) o sal(es) de las mismas. Alternativamente, el grupo ácido carboxílico puede convertirse en un cloruro de acilo o un anhídrido en lugar de utilizar un agente de acoplamiento. Esto se ilustra en el Esquema 3, en donde el círculo representa una superficie, tal como la de un dispositivo médico, Z representa un polímero y el grupo de ácido carboxílico forma parte del polímero.



Recubrimiento para un dispositivo médico

- 5 El presente documento divulga pero no reivindica un recubrimiento para un dispositivo médico, siendo el recubrimiento como se define en el primer aspecto. En particular, se divulga pero no se reivindica un recubrimiento que comprende un polímero de la Fórmula II:



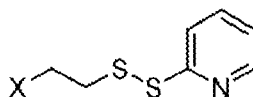
- 10 En el compuesto de Fórmula II, Z puede ser un polímero como se describe en la presente. Por ejemplo, Z puede ser un acrilato o un polímero acrílico, tal como el ácido poliacrílico. Además, el grupo carbonilo del polímero de Fórmula I puede formar parte del polímero Z. El polímero de Fórmula II puede estar unido, por ejemplo, covalentemente, a una superficie, tal como la superficie de un dispositivo médico. Por ejemplo, el polímero de
- 15 Fórmula II puede unirse a una superficie mediante un enlace covalente de Z a la superficie. El recubrimiento puede comprender además agua, de modo que el recubrimiento es un hidrogel. El recubrimiento puede estar en una superficie de un dispositivo médico como se describe en la presente.

Usos de un recubrimiento para evitar la formación de biopelículas en la superficie de un dispositivo médico

- 20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un uso de un recubrimiento para mitigar la formación y/o el crecimiento de biopelículas en la superficie de un dispositivo médico.

El recubrimiento puede comprender:

- 25 polímero Z unido al dispositivo médico (preferiblemente covalentemente) y los restos de la Fórmula A



- 30 en donde X es un grupo amino unido covalentemente a Z o que puede unirse iónicamente a grupos carboxilo libres; y
- en donde el polímero Z es capaz de formar un hidrogel al entrar en contacto con un fluido que contenga agua, tal como agua, una disolución amortiguadora acuosa, una disolución salina acuosa o un fluido corporal que incluya, entre otros, orina, plasma, sangre, fluido de heridas, saliva y líquido cefalorraquídeo, y
- 35 en donde:

Z comprende grupos carboxilo libres en una cantidad de 1-30 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ y/o los restos de acuerdo con la Fórmula A están presentes en el recubrimiento en una cantidad de 0,5-30 nmol/cm^2 .

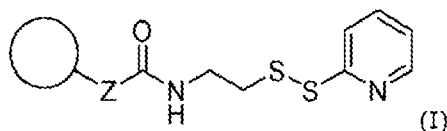
- 40 El polímero Z puede comprender grupos carboxilo libres. El polímero Z puede comprender preferiblemente grupos carboxilo libres en una cantidad de aproximadamente 1-30 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$. En ciertas realizaciones, la concentración superficial de los grupos de ácido carboxílico puede ser de al menos aproximadamente 3 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$, aproximadamente 1-20 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$, aproximadamente 3-20 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$, aproximadamente 1-15 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$, aproximadamente 1-10 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$, aproximadamente 1-7 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ o aproximadamente 1-5 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$. La
- 45 concentración superficial de los grupos de ácido carboxílico de aproximadamente 3-7 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ es la más preferida.

X puede ser un grupo amino primario -NH₂, un grupo amino secundario -NRH, o un grupo amino terciario -NR₂, en donde cada R se selecciona independientemente de alquilo de C₁₋₄. Los ejemplos de alquilo de C₁₋₄ incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo y terc-butilo. En algunas realizaciones, X es un grupo amino primario -NH₂.

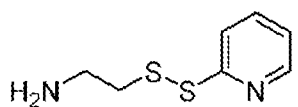
50

X puede estar unido covalentemente a Z en grupos funcionales terminales y/o a grupos funcionales a lo largo de la cadena principal del polímero. Ejemplos de tales grupos funcionales incluyen el carboxi. Alternativamente, X puede unirse iónicamente a grupos carboxilo libres terminales o a grupos carboxilo libres a lo largo de la cadena principal del polímero, como se ha comentado en el primer aspecto.

El recubrimiento puede comprender la estructura de la Fórmula I:



en donde el círculo representa la superficie del dispositivo médico. El recubrimiento puede comprender, adicional o alternativamente, restos de la Fórmula A en donde X es un grupo amino. De este modo, el recubrimiento puede comprender la estructura:



Al menos aproximadamente 1 %mol de los restos de acuerdo con la Fórmula A pueden estar unidos a Z mediante un enlazador covalente, o en un orden creciente de preferencia: al menos aproximadamente 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 %mol, tales como 2-100, 5-100, 10-100, 30-100, 50-100, 80-100, 2-90, 5-90, 10-90, 20-90, 30-90, 50-90, 80-90, 2-70, 5-70, 10-70, 30-70, 50-70, 20-80, 30-90, 40-80 %mol. Al menos un 1 %mol de los restos de acuerdo con la Fórmula A pueden estar asociadas no covalentemente con el recubrimiento, o en un orden creciente de preferencia: al menos aproximadamente 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 %mol, tal como 2-100, 5-100, 10-100, 30-100, 50-100, 80-100, 2-90, 5-90, 10-90, 20-90, 30-90, 50-90, 80-90, 2-70, 5-70, 10-70, 30-70, 50-70, 20-80, 30-90, 40-80 %mol. Es posible que estén presentes al mismo tiempo restos asociados covalentemente y no covalentemente.

Los restos de acuerdo con la Fórmula A pueden estar presentes en una cantidad de aproximadamente 0,5-30 nmol/cm² en el recubrimiento. En ciertas realizaciones, las moléculas de acuerdo con la Fórmula A pueden estar presentes en una cantidad de aproximadamente 0,5-15 nmol/cm², 0,5-12 nmol/cm², aproximadamente 0,5-10 nmol/cm², aproximadamente 0,5-9 nmol/cm², aproximadamente 0,5-8 nmol/cm², aproximadamente 0,5-7 nmol/cm², aproximadamente 0,5-6 nmol/cm², aproximadamente 0,5-5 nmol/cm², aproximadamente 0,5-4 nmol/cm², aproximadamente 0,5-3 nmol/cm², aproximadamente 0,5-2 nmol/cm², aproximadamente 0,5-1 nmol/cm², aproximadamente 1-12 nmol/cm², aproximadamente 1-10 nmol/cm², aproximadamente 1-9 nmol/cm², aproximadamente 1-8 nmol/cm², aproximadamente 1-7 nmol/cm², aproximadamente 1-6 nmol/cm², aproximadamente 1-5 nmol/cm², aproximadamente 1-4 nmol/cm², aproximadamente 1-3 nmol/cm², aproximadamente 1-2 nmol/cm², o aproximadamente 1 nmol/cm².

El recubrimiento puede comprender el polímero Z seleccionado del grupo que consiste en ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido poli-4-vinilbenzoico, ácido poliitacónico, cualquier combinación de los anteriores, y ésteres o amidas de los mismos. El recubrimiento puede comprender además polivinilpirrolidona. El polímero Z puede comprender un polímero de acrilato o un polímero acrílico, tal como el ácido poliacrílico. El polímero Z del recubrimiento puede injertarse a partir del dispositivo médico.

El recubrimiento puede ser como se define en el primer aspecto.

Preferiblemente, la mitigación de la formación y/o el crecimiento de la biopelícula no implica un efecto bactericida o bacteriostático.

El término "comprende" debe interpretarse en el sentido de que incluye, pero no se limita a.

Debe entenderse que los valores numéricos de la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la presente solicitud incluyen los valores numéricos que son iguales cuando se reducen al mismo número de cifras significativas y los valores numéricos que difieren del valor declarado en menos del error experimental de una técnica de medición convencional del tipo descrito en la presente solicitud para determinar el valor.

Todos los rangos divulgados en la presente son inclusivos del extremo recitado e independientemente combinables (por ejemplo, el rango de "de 2 a 10" es inclusivo de los extremos, 2 y 10, y de todos los valores intermedios).

El término "aproximadamente" puede utilizarse para incluir cualquier valor numérico que pueda variar sin cambiar la función básica de dicho valor. Cuando se utiliza con un rango, "aproximadamente" también divulga el rango

definido por los valores absolutos de los dos extremos, por ejemplo, "de aproximadamente 2 a aproximadamente 4" también divulga el rango "de 2 a 4". El término "aproximadamente" puede referirse a más o menos 10% del número indicado.

- 5 La invención se describirá con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

- 10 En este documento, el nombre "2-(piridin-2-ildisulfanil)etanamina" y la estructura química del compuesto de Fórmula I se han generado utilizando el programa ChemDraw Ultra versión 12.0.2.1076. Si el dibujo y el nombre no concuerdan, se considerará que el dibujo es correcto.

Abreviaturas

- 15
- | | |
|--------------------|---|
| AUM | Medio de orina artificial |
| aq. | acuoso |
| BP | benzofenona |
| cfu | unidad formadora de colonias |
| 20 cm ² | centímetro(s) cuadrado(s) |
| DI | desionizar (desionizado/a) |
| G | gramo(s) |
| NHS | N-hidroxisuccinimida; CAS No: 6066-82-6T |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; CAS No: 25952-53-8 |
| 25 EPS | Sustancias poliméricas extracelulares |
| ISO | Organización Internacional de Estandarización |
| L | litro(s) |
| L-cisteína | CAS No: 52-90-4 |
| mg | miligramo(s) |
| 30 μmol | micromol(es) |
| min. | minuto(s) |
| ml | mililitro(s) |
| M | molar(es) |
| MQ | MilliQ |
| 35 nm | nanómetro(s) |
| nmol | nanomol(es) |
| OD | Densidad óptica |
| PAA | Ácido poliacrílico; CAS No: 9003-01-4 |
| PBS | Disolución salina amortiguada con fosfato |
| 40 PDEA | 2-(piridiliditio)etilamina; CAS no: 106139-15-5 |
| Sulfo-NHS | N-hidroxisulfosuccinimida |
| UV | ultravioleta |
| % en peso | porcentaje en peso |
- 45 EIAUM utilizado en la presente tenía la misma composición que la descrita en Letters in Applied Microbiology 1997, 24, 203-206.

Ejemplo 1: Preparación de catéteres Foley de silicona antibiopelícula

- 50 A continuación, se describe un protocolo del proceso de recubrimiento para conseguir un recubrimiento antibiopelícula en los catéteres. Se entenderá que el protocolo puede aplicarse a un único catéter.

Hidrogel PAA

- 55
1. Los catéteres se lavaron en etanol durante 1 minuto.
 2. Los catéteres se secaron a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 3. Los catéteres se sumergieron en disolución etanólica del fotoiniciador BP (5%) seguida de irradiación con luz UV durante 30 segundos.
 4. Los catéteres se lavaron en etanol durante 30 segundos para eliminar el exceso de BP.
 - 60 5. Se preparó una disolución acuosa de monómero de ácido acrílico (10%): Por cada litro de disolución de ácido acrílico: Agua desionizada 900 ml, ácido acrílico 100 ml, sal de Mohr (1,65 g), Cu(NO₃)₂ (1,65g). Se desgasificó la disolución añadiendo una barra agitadora al matraz, se colocó el matraz en una placa agitadora y se agitó al vacío hasta que dejaron de verse burbujas. Tal como se utiliza en la presente, la sal de Mohr pretende sulfato amónico de hierro(II).
 - 65 6. Los catéteres se sumergieron en la disolución acuosa de monómero preparada y, a continuación, se irradiaron con luz ultravioleta durante aproximadamente 4 minutos.

7. Los catéteres se sumergieron en agua desionizada durante 2x10 minutos durante el tratamiento ultrasónico.
8. Los catéteres se sumergieron en etanol durante 60 minutos durante el tratamiento ultrasónico.
9. Los catéteres se secaron durante 30 minutos.

5 Caracterización del hidrogel:

La concentración superficial de ácido poliacrílico injertado se determinó añadiendo una cantidad conocida de NaOH (ac.) a una pieza del catéter en un tubo de ensayo, seguido de la agitación del tubo de ensayo durante 4-24 horas. El NaOH (ac.) restante se valoró con HCl (ac.), y el HCl consumido en la valoración constituyó la base para el cálculo del número de grupos de ácido carboxílico. A continuación, el número de grupos de ácido carboxílico se dividió por la superficie de la pieza de catéter para obtener la concentración superficial de grupos de ácido carboxílico del ácido poliacrílico. Se comprobó que podían alcanzarse concentraciones superficiales de los grupos de ácido carboxílico de 1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ a 30 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

15 Proceso de acoplamiento de PDEA

1. Se preparó una disolución de EDC/NHS; relación 4:1. 0,1 M/0,025 M.
2. Los catéteres se sumergieron en la disolución EDC/NHS durante aproximadamente 10 minutos.
3. Los catéteres se sumergieron en agua desionizada durante 3x15 segundos.
4. Se preparó una disolución de PDEA en una disolución amortiguadora de borato: Por cada 1 litro de disolución amortiguadora de borato: mezcle 6,18 g de H_3BO_3 en 1 L de agua desionizada. El pH se ajustó a 8,5 utilizando NaOH 1 M. Se añadieron 21 mg de PDEA a cada litro de disolución amortiguadora de borato y se mezclaron en un matraz de vidrio.
5. Los catéteres se sumergieron en la disolución de PDEA durante 10 minutos.
6. Los catéteres se sumergieron en agua desionizada durante 3x60 segundos.
7. Los catéteres se sumergieron en una disolución amortiguadora de fosfatos 1M, pH 7,4, durante 6 horas.
8. Los catéteres se sumergieron en agua desionizada durante 3x1 minutos.
9. Los catéteres se secaron a temperatura ambiente durante al menos 6 horas.

30 Justificación de la cantidad de la PDEA unida

En un ejemplo, la carga estimada de PDEA fue del 0,3% en peso con base en el peso total del recubrimiento. El fundamento de esta estimación se basa en el hecho de que la relación de EDC/NHS + PDEA y ácido poliacrílico era de 1:1000. En otras palabras, uno de los 1000 grupos de ácido carboxílico del ácido poliacrílico reaccionó con PDEA proporcionando así una carga del 0,3% en peso con base en el peso total del recubrimiento, lo que corresponde a aproximadamente 6 nmol/cm².

Ejemplo 2: Pruebas de formación y/o crecimiento de biopelícula

40 Las piezas de catéter Foley de silicona se funcionalizaron con ácido poliacrílico y PDEA como se describe en el Ejemplo 1. Cada uno de las piezas de catéter tenía un tamaño de 2 cm (16F).

Se proporcionaron tres piezas de catéter sin recubrimiento como muestras de control. Las muestras de control se sometieron a esterilización por óxido de etileno. Las muestras de control se denominaron Muestra A.

45 Tres piezas de catéter con recubrimiento no se sometieron a esterilización. Estas muestras se denominaron Muestra B.

50 Tres piezas de catéter con recubrimiento se sometieron a esterilización mediante óxido de etileno. Estas muestras se denominaron Muestra C.

Las piezas de catéter de las muestras A, B y C se sometieron a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* como se describe en el protocolo a continuación.

55 Protocolo

1. El día 1 de la prueba se añadió a los tubos de ensayo 1 ml de disolución de AUM recién preparada que contenía 10^9 ufc/ml de *Klebsiella pneumoniae* (AO15200).

60 2. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 7 días, cambiando la disolución de AUM todos los días excepto el fin de semana.

3. El día 8, las muestras se fijaron del siguiente modo: a) 5 min de glutaraldehído al 1% en PBS; b) 15 min de etanol al 60%; c) 15 min de etanol al 80%; d) secar.

65 4. Las muestras se tiñeron con violeta cristal al 0,04% en disolución acuosa durante 5 min., después se enjuagaron

con agua MQ y se secaron. De este modo, se tiñeron todas las bacterias o biopelículas presentes en la superficie de la muestra.

5. Las muestras se transfirieron a una cinta adhesiva y se fotografiaron.

6. El violeta cristal de las piezas de cinta scotch se disolvió en 2 ml de etanol al 95% y se cuantificó midiendo la densidad óptica con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Siguiendo el protocolo, las fotografías mostraron una tinción clara para las piezas de la Muestra A. Por el contrario, las piezas de las Muestras B y C no se tiñeron sustancialmente.

Además, los resultados de la medición espectrofotométrica fueron los indicados en la Tabla 1.

Tabla 1

Densidad óptica a 525 nm para las muestras de control de la Muestra A	Densidad óptica a 525 nm para las muestras no esterilizadas de la Muestra B	Densidad óptica a 525 nm para las muestras esterilizadas de la Muestra C
0,642	0,013	0,019
0,917	0,013	0,008
0,595	0,028	0,009

Se calculó la densidad óptica media de las muestras de la Tabla 1 y se ilustra en la Figura 1. Como muestran la Tabla 1 y la Figura 1, las piezas de las Muestras B y C presentaban una tinción significativamente menor que las piezas de la Muestra A.

Con base en las fotografías y en las mediciones espectrofotométricas, se llegó a la conclusión de que la formación y/o el crecimiento de la biopelícula se redujo significativamente en presencia del recubrimiento que contenía PDEA, como se observó en las Muestras B y C, respectivamente.

Ejemplo 3: Pruebas de resistencia a la abrasión

En este ejemplo, se probó la resistencia a la abrasión de los catéteres recubiertos preparados como se describe en el Ejemplo 1. Se utilizaron cuatro métodos de prueba diferentes en un catéter recubierto o en una sección de tubo recubierto de catéter (por ejemplo, de 6 cm de longitud), específicamente: (1) prueba de pellizco en seco, (2) prueba de pellizco en húmedo, prueba de pellizco en gel y (4) prueba de flexión. Los protocolos de los métodos de prueba fueron los que se describen a continuación.

Prueba de pellizco en seco

Se lleva a cabo en un catéter recubierto o en una sección de tubo recubierto del catéter (por ejemplo, de 6 cm de longitud).

1. Sujetando el catéter recubierto (o la sección de catéter recubierta), utilizar una mano enguantada y seca para pellizcar suavemente el catéter recubierto entre el índice y el pulgar. Frotar suavemente la superficie del catéter recubierto longitudinalmente 10 veces en un área de 4 cm.

2. Someter el catéter recubierto abrasionado (o la sección de catéter recubierta) a la prueba de tinte descrita en la presente y comparar con un control recubierto (sin abrasión en seco) para valorar visualmente cualquier daño en el recubrimiento y la resistencia a la abrasión leve.

Prueba de pellizco en húmedo

Se lleva a cabo en un catéter recubierto o en una sección de tubo recubierto del catéter (por ejemplo, de 6 cm de longitud).

1. Sujetando el catéter recubierto (o la sección de catéter recubierta), utilizar una mano enguantada y húmeda para pellizcar suavemente el catéter recubierto entre el índice y el pulgar. Frotar suavemente la superficie del catéter recubierto longitudinalmente 10 veces en un área de 4 cm.

2. Someter el catéter recubierto abrasionado (o la sección de catéter recubierta) a la prueba de tinte descrita en la presente y comparar con un control recubierto (sin abrasión en húmedo) para valorar visualmente cualquier daño en el recubrimiento y la resistencia a la abrasión leve.

Prueba de pellizco en gel

Se lleva a cabo en un catéter recubierto o en una sección de tubo recubierto del catéter (por ejemplo, de 6 cm de longitud).

1. Aplicar generosamente gel de lidocaína (o similares) entre el pulgar y el índice de una mano enguantada y seca.

2. Sujetando el catéter recubierto (o la sección de catéter recubierta), utilizar la mano enguantada recubierta de gel de lidocaína (o similar) para pellizcar suavemente el catéter recubierto entre el índice y el pulgar. Frotar suavemente la superficie del catéter recubierto longitudinalmente 10 veces en un área de 4 cm.

3. Tras la abrasión, el catéter o la pieza de catéter debe enjuagarse con agua desionizada para eliminar el exceso de gel de la superficie.

4. Someter el catéter recubierto abrasionado (o la sección de catéter recubierta) a la prueba de tinte descrita en la presente y comparar con un control recubierto (sin abrasión en gel) para valorar visualmente cualquier daño en el recubrimiento y la resistencia a la abrasión leve.

Prueba de flexión

Se lleva a cabo en un catéter recubierto o en una sección de tubo recubierto del catéter (por ejemplo, de 6 cm de longitud).

1. Sujetando el catéter recubierto (o la sección de catéter recubierta), utilizar las manos enguantadas y secas para doblar y girar suavemente el catéter recubierto 10 veces.

2. Someter el catéter recubierto (o la sección del catéter recubierta) a la prueba del tinte descrita en la presente y comparar con un control recubierto (sin doblado ni torsión) para valorar visualmente cualquier daño en el recubrimiento y la resistencia al doblado y a la torsión.

Prueba del tinte

La prueba del tinte descrita en la presente se realizó sumergiendo el catéter o la sección del tubo del catéter en una disolución acuosa que contenía violeta cristal durante 60 segundos. A continuación, se retiró el catéter o la sección del tubo del catéter de la disolución acuosa y se sumergió en agua desionizada durante 60 segundos, tras lo cual se retiró de la disolución. A continuación, se evaluó visualmente la consistencia del color, es decir, la uniformidad del color. Las áreas recubiertas se teñirán de un color morado / azul oscuro, mientras que las áreas no recubiertas no absorberán el tinte y, por lo tanto, no se colorearán. La calidad del recubrimiento también se valoró visualmente para ver si había algún agrietamiento, descamación y/o delaminación del recubrimiento.

Se hicieron dos réplicas para cada método de prueba.

Los resultados fueron los que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Ejemplo No.	Método de prueba	Color	Calidad del recubrimiento
1	Prueba de pellizco en seco	Homogéneo, liso y púrpura.	Sin grietas, sin descamación.
2	Prueba de pellizco en húmedo	Homogéneo, liso y púrpura.	Sin grietas, sin descamación.
3	Prueba de pellizco en gel	Homogéneo, liso y púrpura.	Sin grietas, sin descamación.
3	Prueba de flexión	Homogéneo, liso y púrpura.	Sin grietas, sin descamación.

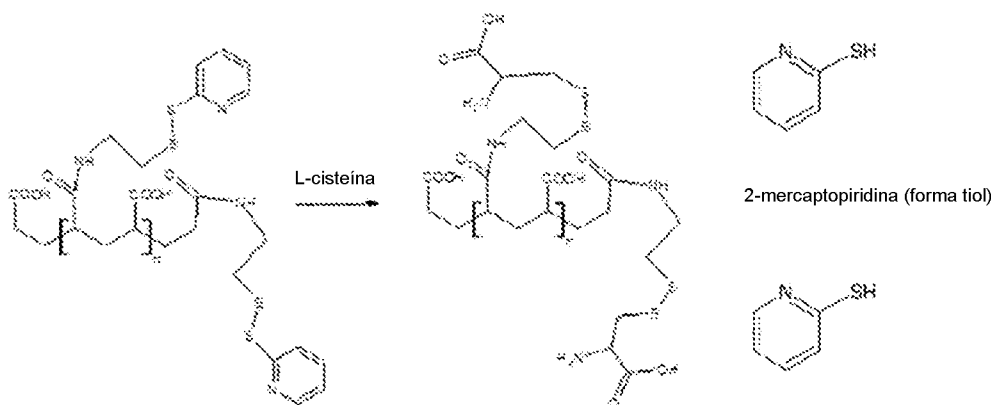
Como se muestra en la Tabla 2, el recubrimiento no se desgastó en las pruebas. Se concluyó que los productos sanitarios recubiertos descritos en la presente, tales como los catéteres descritos en la presente, son resistentes a la abrasión. Por lo tanto, el recubrimiento de los productos sanitarios descritos en la presente resiste el desgaste, tal como el que se produce durante el uso.

Ejemplo 4: Prueba de citotoxicidad

Una pieza de catéter fabricado de acuerdo con el Ejemplo 1 se sometió a una prueba de citotoxicidad MTT de acuerdo con el estándar ISO 10993-5:2009. El MTT es la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro. En esta prueba, el MTT amarillo soluble en agua se reduce metabólicamente en células viables a un formazán insoluble azul-violeta. El número de células viables se correlaciona con la intensidad del color determinada por mediciones fotométricas tras disolver el formazán en alcohol. No se observó citotoxicidad cuando la pieza de catéter se sometió a la prueba MTT.

Ejemplo 5: Determinación de la cantidad de PDEA en el recubrimiento

Para estimar la cantidad de PDEA unida en el catéter recubierto fabricado en el Ejemplo 1, se añadió L-cisteína a las muestras recubiertas en disolución. Cuando la L-cisteína reacciona con la PDEA, se libera 2-mercaptopiridina, que puede medirse mediante espectrofotometría UV (342 nm); véase el Esquema A a continuación.



Esquema A

Siempre que la reacción anterior sea completa, es decir, que toda la PDEA reaccione con la L-cisteína, la cantidad de 2-mercaptopiridina liberada representa la cantidad de PDEA presente en el recubrimiento. La reacción se producirá de forma similar incluso cuando la PDEA esté unida no covalentemente (por ejemplo, iónicamente) (esquema no mostrado).

Para garantizar una reacción completa, se añadió nueva disolución de L-cisteína de forma incremental cada 10 minutos hasta que no se detectó más 2-mercaptopiridina, con lo que la reacción se consideró completa:

1. Las muestras recubiertas se prepararon a partir de catéteres recubiertos de tamaño FR-16. Dos piezas de catéter de 5 cm se cortaron por la mitad, para tener cuatro muestras con una superficie total de recubrimiento de 13,5 cm²/muestra.
2. Se preparó una disolución de 100 ml de L-cisteína (0,072 M).
3. Se añadieron 5 ml de disolución de L-cisteína a las muestras y se inició la reacción.
4. La disolución de L-cisteína se retiró al cabo de 10 minutos y la 2-mercaptopiridina se midió en UV a 342 nm.
5. Los pasos (3) y (4) se repitieron hasta que no pudo detectarse más 2-mercaptopiridina.

La cantidad acumulada de 2-mercaptopiridina medida y, por lo tanto, de PDEA reaccionada, se muestra en la Figura 2.

En total, se realizaron 12 rondas sucesivas de reacciones de acoplamiento de 10 minutos. Se determinó que la cantidad total de PDEA presente en el recubrimiento era de 2,22 nmol/cm². Aproximadamente, la mitad del PDEA total (1 nmol/cm²) reaccionó con la L-cisteína durante los primeros 10 minutos y no se detectó 2-mercaptopiridina adicional tras 10 rondas de acoplamientos.

Ejemplo de referencia 6: Determinación de la cantidad de PDEA en el recubrimiento de un producto de generación anterior

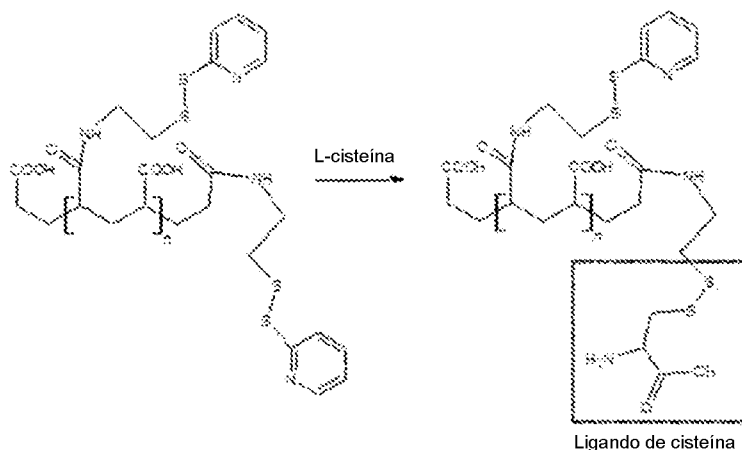
La especificación de recubrimiento anterior se aplicó al tipo de cánula nasal de silicona utilizada en el primer estudio en el ser humano (Odeberg et al, *supra*). El objetivo de este experimento era medir las cantidades de PDEA y ligando de cisteína presentes en el recubrimiento de la generación anterior.

El principal componente del recubrimiento anterior era el ácido poliacrílico. En el recubrimiento anterior, se utilizó la polimerización inducida por haz de electrones (EB) de radicales libres en lugar de la polimerización inducida por UV utilizada en los ejemplos anteriores.

La cantidad de PAA en el recubrimiento anterior era de aproximadamente $\sim 4 - 15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

La PDEA se unió covalentemente a la superficie de acuerdo con un método similar al del Ejemplo 1, salvo que se utilizaron concentraciones más elevadas de EDC/NHS y PDEA.

Tras el acoplamiento con PDEA, se acopló un ligando de cisteína de acuerdo con el Esquema B:



Esquema B

Se utilizó un método similar al del Ejemplo 5 para determinar la cantidad de PDEA sin reaccionar restante (con la excepción de que se realizaron 18 rondas sucesivas de reacciones de acoplamiento).

Para el intermedio acoplado PDEA, la cantidad acumulada de 2-mercaptopiridina medida, y por lo tanto, de PDEA reaccionada, se muestra en la Figura 3.

El punto de datos de 10 minutos representa el procedimiento de fabricación. Por lo tanto, debido a la elevada cantidad de PDEA y a una reacción con L-cisteína relativamente corta (10 minutos), no se consumió toda la PDEA en el proceso de recubrimiento anterior. Por lo tanto, el recubrimiento anterior contenía tanto PDEA unida covalentemente como ligando de cisteína.

Como se observa en la Figura 3, la cantidad total de ligando de PDEA acoplado en el proceso de fabricación fue de aproximadamente $257 \text{ nmol}/\text{cm}^2$.

Tras el primer acoplamiento de cisteína de 10 minutos, la cantidad acumulada de 2-mercaptopiridina medida, que representa la PDEA sin reaccionar, se muestra en la Figura 4. Con base en los resultados, se estimó que la cantidad restante de ligando de PDEA tras la finalización del proceso de fabricación era de al menos aproximadamente $65 \text{ nmol}/\text{cm}^2$.

En resumen, el recubrimiento anterior contenía aproximadamente un 74% ($191 \text{ nmol}/\text{cm}^2$) de ligando de cisteína y un 26% de PDEA ($66 \text{ nmol}/\text{cm}^2$).

En comparación con el recubrimiento del Ejemplo 1, el recubrimiento anterior contenía al menos 25 veces más PDEA unida, es decir, $>65 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ en comparación con $2,2 \text{ nmol}/\text{cm}^2$.

Ejemplo 7: Dosis-respuesta para diversas cantidades de PDEA

El objetivo de este experimento era determinar la curva dosis-respuesta para diferentes niveles de PDEA unida en el recubrimiento. El límite de PDEA para el que el recubrimiento inhibe el crecimiento bacteriano es de especial interés ya que el modo de acción cambia; de un recubrimiento que previene la formación de biopelículas que no depende de la inhibición del crecimiento bacteriano (presente invención) a la especificación anterior de recubrimiento "inhibidor del crecimiento bacteriano".

Los catéteres recubiertos de silicona de tamaño Fr14 se injertaron con PAA y las muestras se cortaron en piezas de 2,5 cm. La titulación determinó la cantidad de PAA en $\sim 6,5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ (véase el Ejemplo 1).

El acoplamiento se realizó como en el Ejemplo 1, utilizando la misma concentración de EDC/NHS pero con diferentes concentraciones de PDEA. La cantidad de PDEA unida se determinó mediante UV (342 nm) midiendo la 2-mercaptopiridina liberada tras hacer reaccionar las muestras con L-cisteína (véase la descripción del método

en el Ejemplo 5). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Control (sin recubrimiento)	S5	S4	S3	S2	S1
0 nmol/cm ²	6 nmol/cm ²	13 nmol/cm ²	39 nmol/cm ²	77 nmol/cm ²	154 nmol/cm ²

Ensayo antibacteriano - Prueba de Ahearn

- Cepa bacteriana: *Escherichia coli* CFT073
- Iniciar el inóculo: 15×10^5 CFU/ml
- Medio: Medio de orina artificial (AUM)
- Se utilizaron triplicados para cada muestra probada

Se utilizó el procedimiento de la prueba de Ahearn para determinar las unidades formadoras de colonias de bacterias en la superficie y en el AUM tras 3 horas de incubación con bacterias.

1. La muestra de prueba (2,5 cm, Fr14, superficie total 5,8 cm²) se incubó en una disolución amortiguadora de fosfato durante toda la noche, a temperatura ambiente, con rotación lenta.
2. Los especímenes de prueba se colocaron en un tubo de 2 ml.
3. Se colocaron 2 ml de AUM con *E. coli* (15×10^5 UFC/ml) en el interior del tubo.
4. Se incubaron durante 3 horas a 37 ± 2 °C.
5. Muestras tomadas para las diluciones.
6. Las muestras se lavaron con 2×2 ml de PBS para eliminar las bacterias poco adheridas: la suspensión bacteriana se desechó.
7. Tras el lavado, las muestras se colocaron en un nuevo tubo de microcentrifuga de 2 ml.
8. Para recuperar las bacterias adheridas: Se añadió 1 ml de PBS con Tween-20 al 0,05% a cada tubo, se agitaron en vórtice durante 30 segundos, seguidos de sonicación durante 5 min (40 kHz en un baño de ultrasonidos, Branson, con una potencia de salida de 100 W en condiciones ambientales), y se agitaron de nuevo en vórtice durante 30 segundos.
9. Se prepararon diluciones seriadas en PBS, se untaron con perlas de vidrio y se colocaron en placas LA. Las diluciones 0, -10, -100 se colocaron en placas.

Los resultados se muestran en las Figuras 5 (bacterias adheridas) y 6 (bacterias en el medio). Existe una relación dosis-respuesta que demuestra una clara inhibición de las bacterias tanto en la superficie del catéter como en el medio de orina artificial (AUM) a partir de un rango superior a 30 nmol/cm². Por el contrario, las cantidades unidas más bajas de PDEA no tienen ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. Por el contrario, en realidad hay un número ligeramente superior de bacterias adherentes tanto en las muestras de 6 nmol/cm² como en las de 13 nmol/cm² en comparación con el control.

Se estimaron los valores de la concentración inhibitoria media máxima (IC50) para la PDEA unida, que se sitúan en 39 nmol/cm² en la superficie y 30 nmol/cm² en el AUM (valores interpolados).

La reducción logarítmica para la PDEA unida a 77 nmol/cm² es de 1,55 log CFU/cm² y 2,77 log CFU/ml, lo que concuerda con la solicitud de patente anterior (WO 2006/101438 A1) y la cantidad estimada de PDEA unida en el recubrimiento de la técnica anterior (más de 65 nmol/cm²).

En conclusión, el rango de "no inhibición del crecimiento bacteriano" para la PDEA unida se define como inferior a 30 nmol/cm².

Ejemplo 8: Ninguna acción metabólica ni farmacológica del recubrimiento inventivo

El objetivo con este experimento era demostrar que el recubrimiento inventivo (denominado en la presente CytaCoat) no tiene ninguna acción metabólica ni farmacológica sobre las bacterias. En la prueba se incluyeron las siguientes bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

- *Klebsiella pneumoniae* AO15200 (aislado clínico)
- *Staphylococcus epidermidis* Se19 (aislado clínico)

En la prueba se utilizaron muestras sin recubrimiento y con recubrimiento de un catéter de silicona de tamaño Fr20:

- Catéter sin tratar, piezas de 2 cm ("Control")

➤ Muestras de catéter CytaCoat, piezas de 2 cm ("Cytacoat").

El material "CytaCoat" se fabricó como se describe en los ejemplos anteriores y, por lo tanto, tenía aproximadamente 2,2 nmol/cm² de PDEA en el recubrimiento.

La configuración del experimento se ilustra en la Figura 9.

Semana 1:

1. En el experimento se utilizaron 6 muestras de catéteres de control y 6 muestras de catéteres CytaCoat.
2. El Día 1 de la prueba se añadió a los tubos 1 ml de disolución de orina artificial recién preparada que contenía 10⁹ ufc/ml de células de *K. pneumoniae* o *S. epidermidis*.
3. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 7 días, el AUM se cambió todos los días excepto los fines de semana.
4. Cuando se cambió el AUM, las muestras se lavaron dos veces en 1,5 ml de PBS en nuevos tubos de microcentrifuga y se transfirieron a 1,5 ml de AUM fresco en un nuevo tubo de microcentrifuga.
5. El día 8, se tomaron 3 muestras para la cuantificación de la biopelícula con violeta cristal. Se fijaron del siguiente modo: a) 5 min de glutaraldehído al 1% en PBS; b) 15 min de etanol al 60%; c) 15 min de etanol al 80%; d) secar.
6. Estas muestras se tiñeron con violeta cristal al 0,04% en disolución acuosa durante 5 minutos, después se enjuagaron con agua Milli Q y se secaron. Se retiró la biopelícula con un hisopo de algodón limpio, se extrajo el violeta cristal con 1,5 ml de EtOH al 95% durante 3 h y se midió la DO595 nm (Fig. 8).
7. De los tubos que contenían otras 3 muestras se tomaron alícuotas para diluciones seriadas y recuento de colonias, valorando las unidades formadoras de colonias en el cultivo líquido (Fig. 7).
8. Esas muestras se lavaron dos veces en 1,5 ml de PBS en nuevos tubos de microcentrifuga y se transfirieron a 1,5 ml de AUM fresco en un nuevo tubo de microcentrifuga. La biopelícula de estas muestras se eliminó y se rompió con un tratamiento de 30 segundos con un homogeneizador ultrasónico portátil mezclador disruptor celular y sonicador celular. Se tomaron alícuotas para diluciones seriadas y recuento de colonias valorando las unidades formadoras de colonias en el catéter (Fig. 7).
9. Las bacterias resultantes de la biopelícula en AUM se transfirieron a tubos Eppendorf nuevos, todos ellos con piezas de catéter de control, y el experimento continuó durante otra semana (véase a continuación, Semana 2).

Semana 2:

10. Las muestras del experimento de la semana anterior se incubaron a 37 °C durante 7 días con cambio de AUM todos los días excepto los fines de semana.
11. El día 15, se tomaron 2 muestras para el procedimiento de cuantificación de la biopelícula con violeta cristal. Se fijaron del siguiente modo: a) 5 min de glutaraldehído al 1% en PBS; b) 15 min de etanol al 60%; c) 15 min de etanol al 80%; d) secar.
12. Estas muestras se tiñeron con violeta cristal al 0,04% en disolución acuosa durante 5 minutos, después se enjuagaron con agua Milli Q y se secaron. Se retiró la biopelícula con un hisopo de algodón limpio, se extrajo el violeta cristal con 1,5 ml de EtOH al 95% durante 3 h y se midió la DO595 nm (Fig. 8).
13. Se seleccionó 1 muestra de control y CytaCoat para su visualización microscópica. Las piezas de muestra se tiñeron con la sonda Ebba Biotech Red (680 nm)/Concanavalina A-Alexa de la siguiente manera:

- a) La disolución de trabajo de los tintes se preparó de la siguiente manera: 1 µl de Ebba Biolight Red (630 nm) y 1 µl de Concanavalina A, conjugado de Alexa FluorTM 594 (50 µg/ml).
- b) Las piezas de muestra se colocaron en 1 ml de disolución colorante y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- c) Tras la tinción, las piezas de muestra se enjuagaron brevemente en agua y se lavaron adicionalmente en 1 ml de agua en la oscuridad.
- d) Tras la tinción, las piezas se visualizaron en el microscopio de fluorescencia.

Discusión

Tras la primera semana, tanto *K. pneumoniae* como *S. epidermidis* formaron EPS/biopelícula en el control, mientras que las muestras de catéter CytaCoat casi no mostraron biopelícula detectable. Después de la semana 2, cuando las bacterias preexpuestas de la primera semana se transfirieron a los catéteres de control, formaron aún más EPS/biopelícula en comparación con la semana 1. La formación de biopelículas en la superficie de control la semana 2 fue independiente de si las bacterias estuvieron expuestas al catéter CytaCoat o al catéter de control durante la semana 1.

Conclusión

La superficie CytaCoat no impide el crecimiento de *K. pneumoniae* AO15200 ni de *S. epidermidis* Se19, al tiempo que evita la formación normal de biopelículas. Además, las bacterias que crecen en la superficie CytaCoat no muestran cambios en sus propiedades y siguen siendo capaces de formar biopelículas cuando se transfieren a las superficies de los catéteres de silicona de control.

Los resultados indican que el recubrimiento CytaCoat crea un entorno local antibiopelícula y que no tiene ninguna acción auxiliar metabólica ni farmacológica sobre las bacterias.

5 Referencias

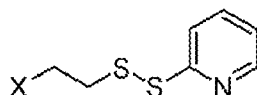
1. WO 2006/101438 A1
2. Letters in Applied Microbiology 1997, 24, 203-206
3. Jacob Odeberg , Anders Wirsén , Åke Norberg , Jakob Frie , Gordana Printz , Hugo Lagercrantz , Gudmundur H Gudmundsson , Birgitta Agerberth , Baldvin Jonsson ;

A novel cysteine-linked antibacterial surface coating significantly inhibits bacterial colonization of nasal silicone prongs in a phase one pre-clinical trial. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 1 Dic 2018;93:782-789

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo médico que comprende un recubrimiento, en donde dicho recubrimiento comprende:

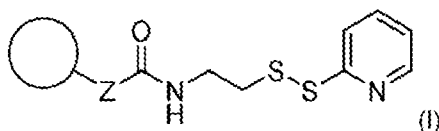
- 5 polímero Z unido al dispositivo médico
y restos de la Fórmula A



Fórmula A

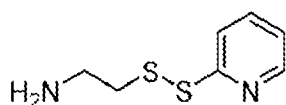
- 10 en donde X es un grupo amino unido covalentemente a Z o que puede unirse iónicamente a grupos carboxilo libres;
en donde los restos de acuerdo con la Fórmula A están presentes en el recubrimiento en una cantidad de 0,5-30
nmol/cm²; y
en donde el polímero Z comprende grupos carboxilo libres en una cantidad de 1-30 μmol/cm².

- 15 2. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el
recubrimiento comprende la estructura de la Fórmula I:



- 20 en donde el círculo representa la superficie del dispositivo médico.

3. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el
recubrimiento comprende restos de la Fórmula A en donde X es un grupo amino primario -NH₂, un grupo amino
secundario -NRH, o un grupo amino terciario -NR₂, en donde cada R se selecciona independientemente de alquilo
de C₁₋₄, o en donde el recubrimiento comprende la estructura:



4. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos un
20 %mol de los restos de acuerdo con la Fórmula A están unidos a Z mediante un enlace covalente y/o en donde
al menos un 20 %mol de los restos de acuerdo con la Fórmula A están asociados iónicamente con el recubrimiento.

5. El dispositivo médico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los restos de
acuerdo con la Fórmula A están presentes en una cantidad de 0,5-15 nmol/cm² en el recubrimiento, y/o
35 en donde el polímero Z comprende grupos carboxilo libres en una cantidad de 3-7 μmol/cm².

6. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho
recubrimiento comprende

- 40 2-(piridilditio)etilamina (PDEA) unida covalentemente a un polímero, en donde dicho polímero está unido
covalentemente al dispositivo médico
en donde
la PDEA está presente en una cantidad del 0,001% en peso al 1% en peso con base en el peso total del
recubrimiento, preferiblemente del 0,01% en peso al 1% en peso.

- 45 7. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polímero Z
está unido covalentemente al dispositivo médico y/o en donde el polímero Z del recubrimiento está injertado del
dispositivo médico.

- 50 8. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el
recubrimiento comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en ácido poliacrílico, ácido
polimetacrílico, ácido poli-4-vinilbenzoico, ácido poliitacónico, cualquier combinación de los anteriores y ésteres o
amidas de los mismos.

- 55 9. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polímero Z

comprende un polímero de acrilato o un polímero acrílico, tal como el ácido poliacrílico.

10. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dispositivo médico se selecciona del grupo formado por una sonda (preferiblemente una sonda de Foley), un tubo endotraqueal, un tubo traqueal, un stent, una cánula nasal, un audífono, una jeringa, un catéter venoso central, un stent ureteral, un apósito o apósitos para heridas, un respirador, una mascarilla facial y un implante.

11. El dispositivo médico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el

dispositivo médico comprende

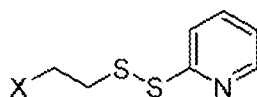
un polímero, tal como un polímero termoplástico y/o termoestable, y/o un metal, en donde

el polímero comprende preferiblemente uno o varios de los siguientes: silicona, polietileno, polipropileno, poliuretano, cloruro de polivinilo, policaprolactona, policarbonato, caucho, tal como caucho de látex, poliéter éter cetona (PEEK) y/o

el metal comprende preferiblemente uno o más de los siguientes: acero, tal como el acero inoxidable, aleación, tal como la aleación a base de cobalto o nitinol, titanio.

12. Uso de un recubrimiento para mitigar la formación y/o el crecimiento de biopelículas en la superficie de un dispositivo médico, en donde dicho recubrimiento comprende:

polímero Z unido al dispositivo médico y restos de la Fórmula A



Fórmula A

en donde X es un grupo amino unido covalentemente a Z o que puede unirse iónicamente a grupos carboxilo libres; y

en donde el polímero Z es capaz de formar un hidrogel al entrar en contacto con un fluido que contiene agua, y en donde:

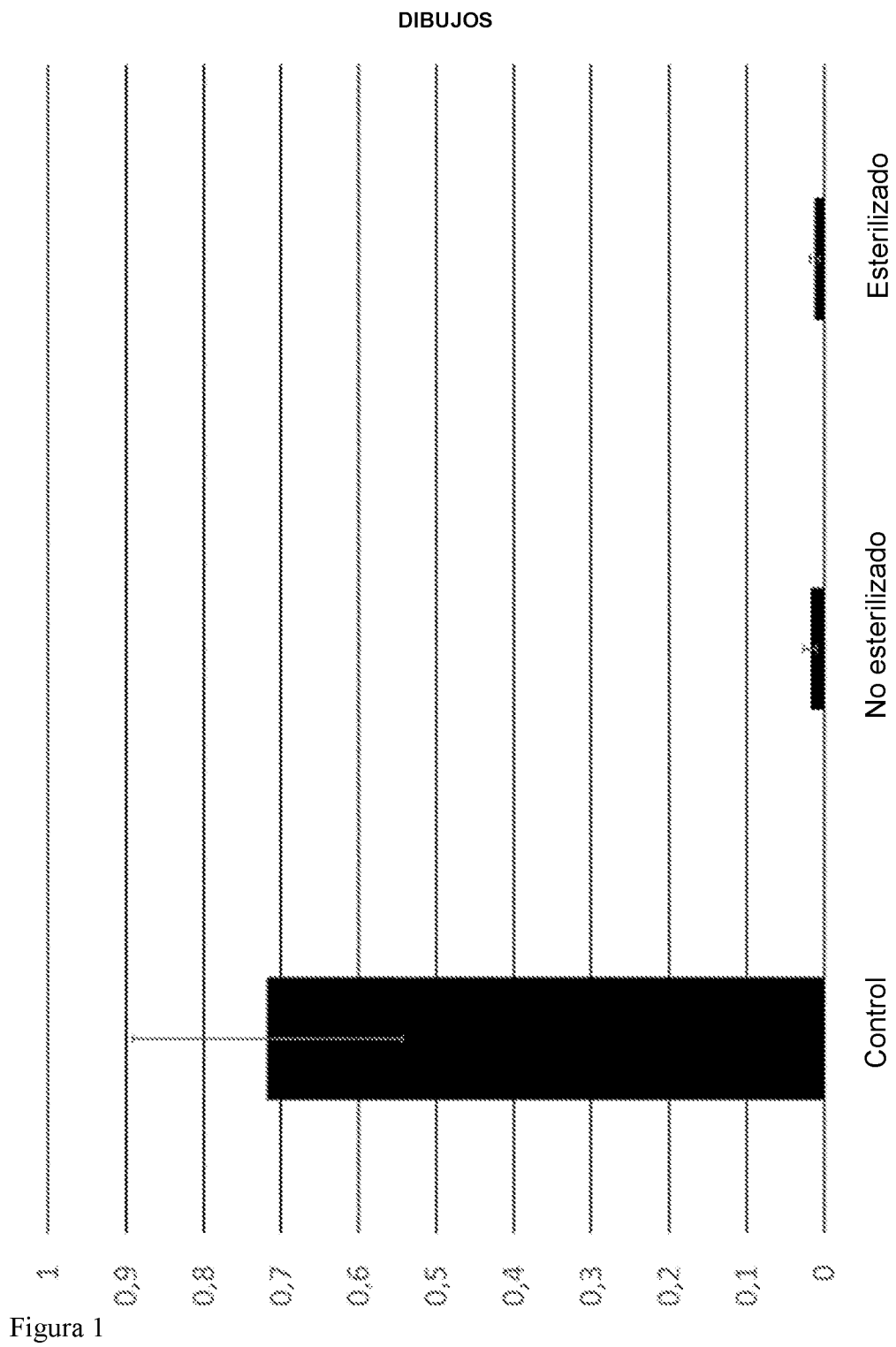
Z comprende grupos carboxilo libres en una cantidad de 1-30 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ y/o

los restos de acuerdo con la Fórmula A están presentes en el recubrimiento en una cantidad de 0,5-30 nmol/cm^2

13. El uso de conformidad con la reivindicación 12, en donde Z comprende grupos carboxilo libres en una cantidad de 1-30 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$, preferiblemente en una cantidad de 3-20 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$.

14. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en donde los restos de acuerdo con la Fórmula A están presentes en el recubrimiento en una cantidad de 0,5-30 nmol/cm^2 , preferiblemente en una cantidad de 0,5-15 nmol/cm^2 .

15. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde el recubrimiento es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9.



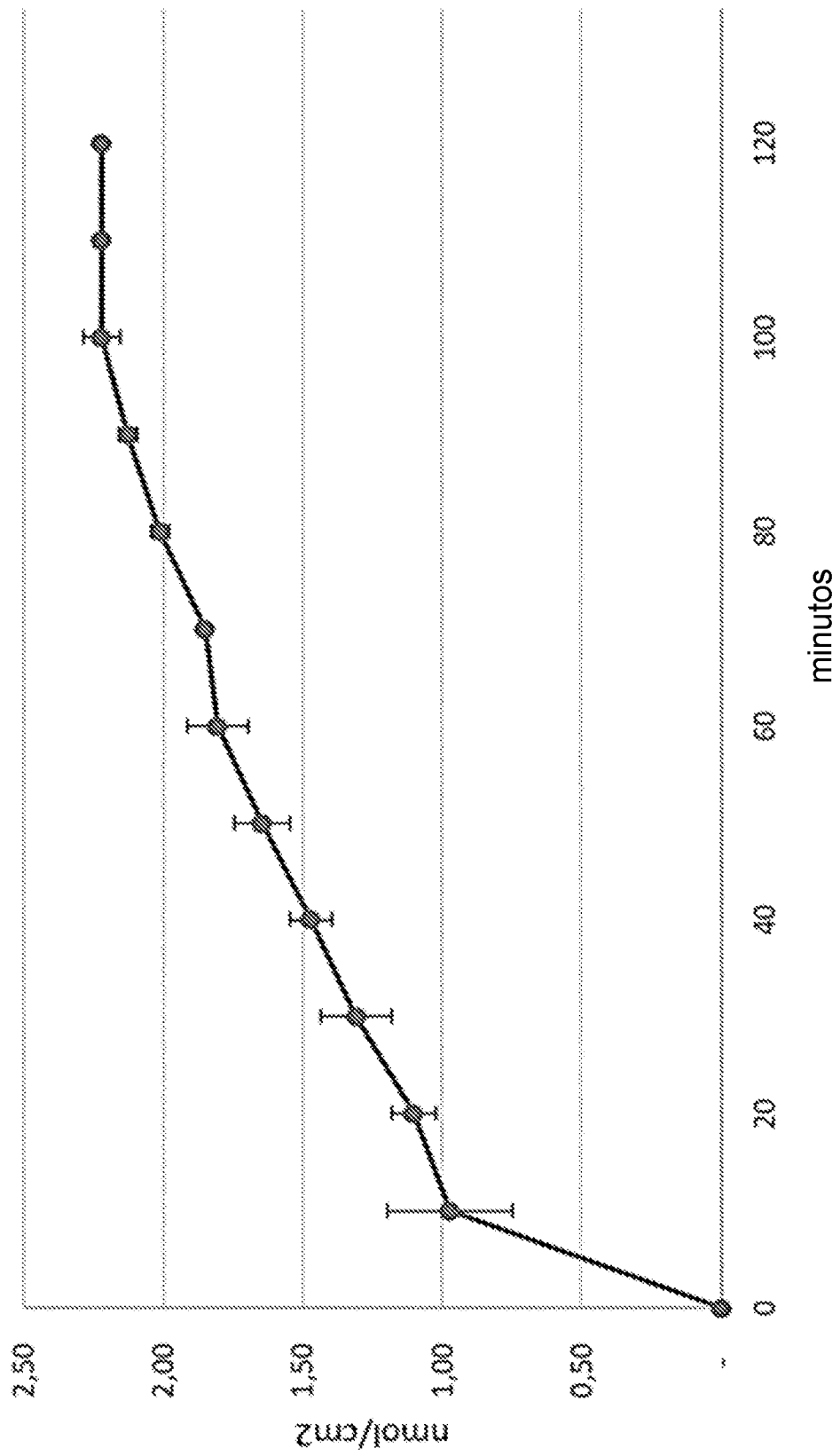


Fig 2.

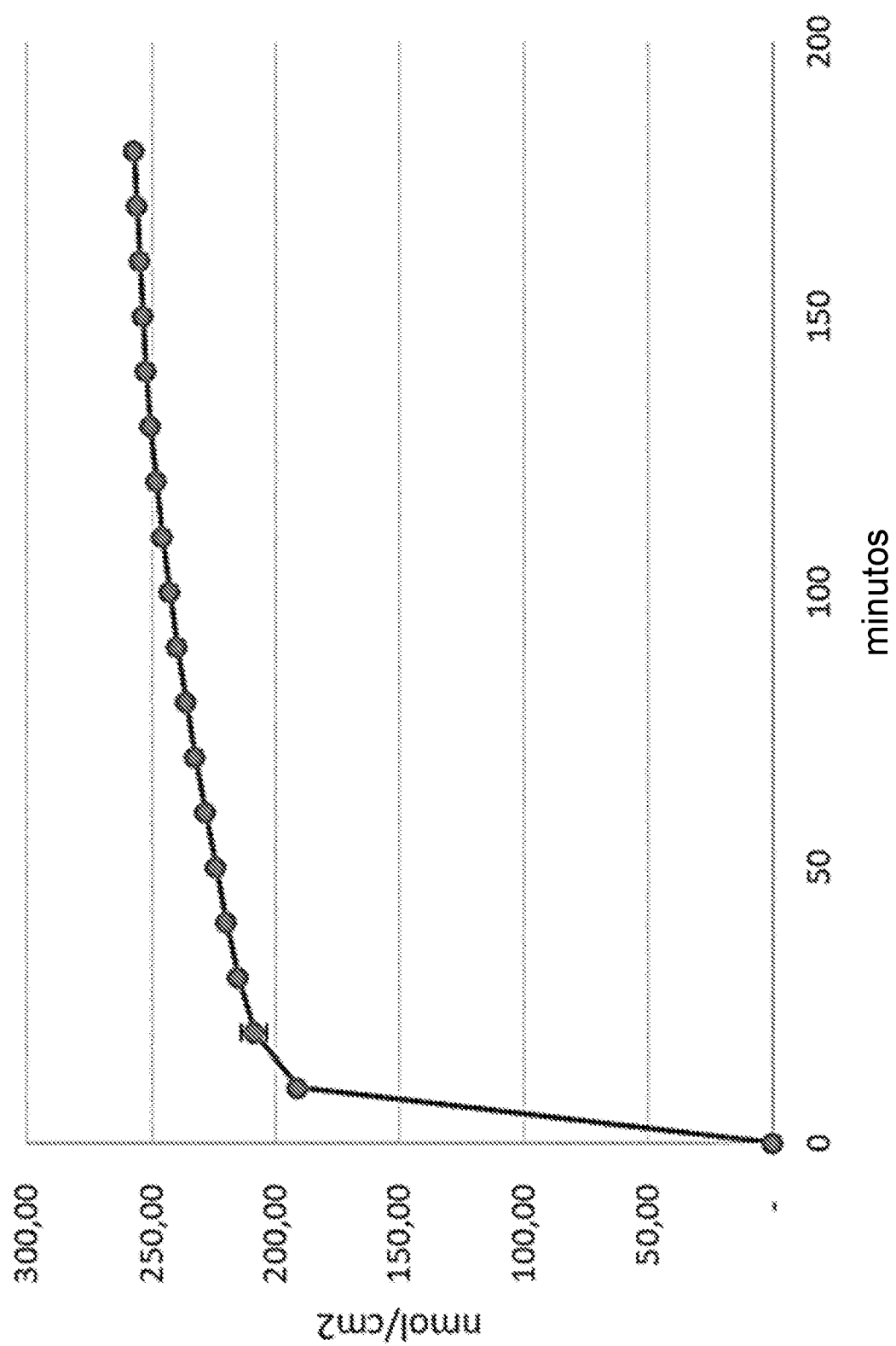


Fig 3

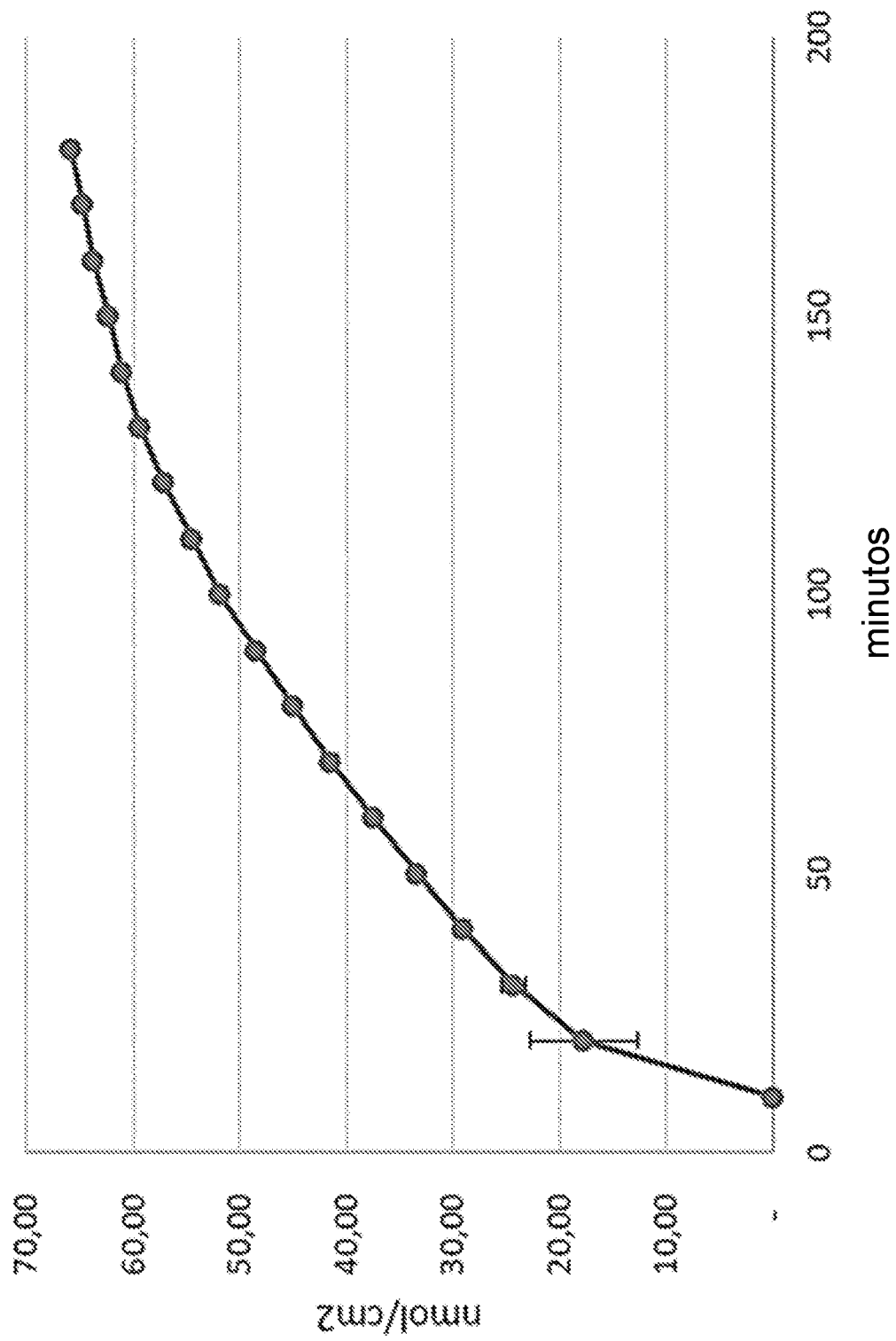


Fig 4.

E. coli en superficie

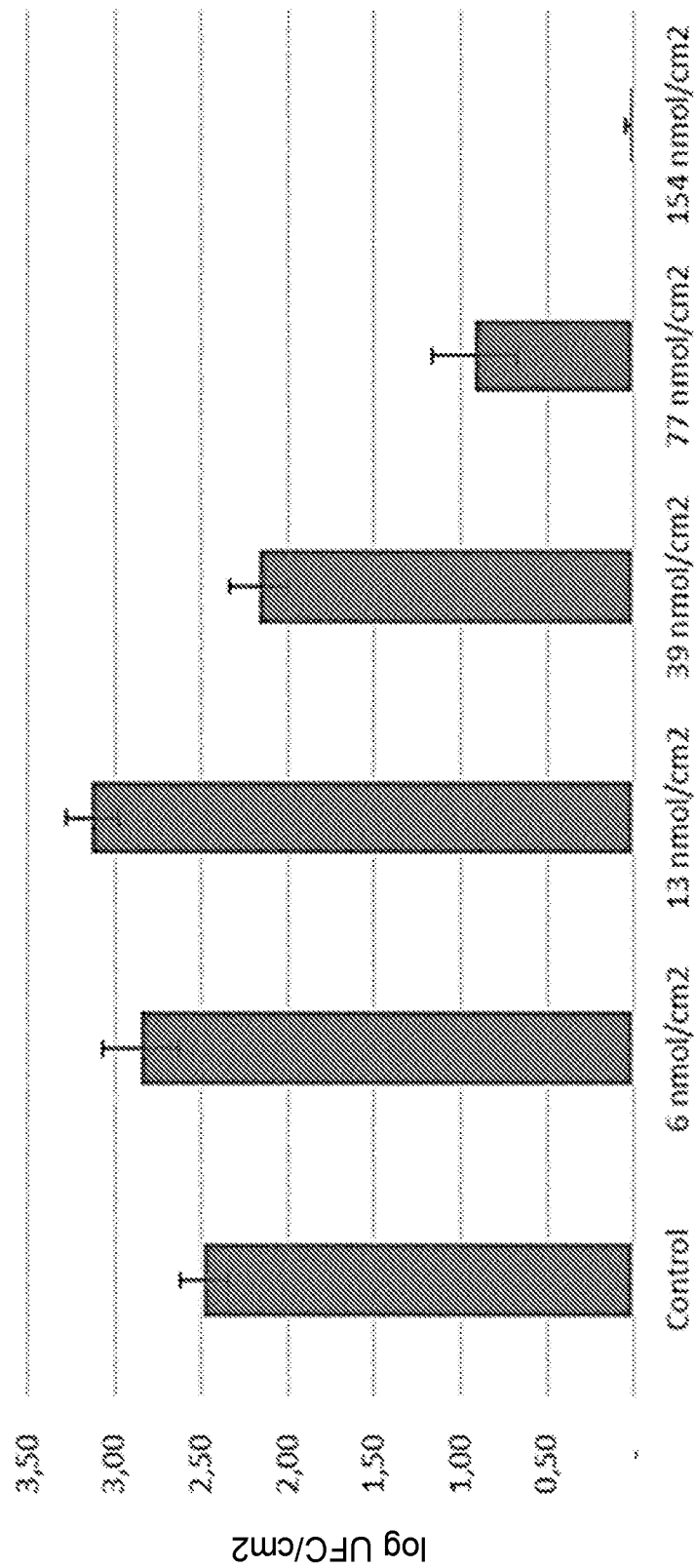


Fig 5.

E. coli en AUM

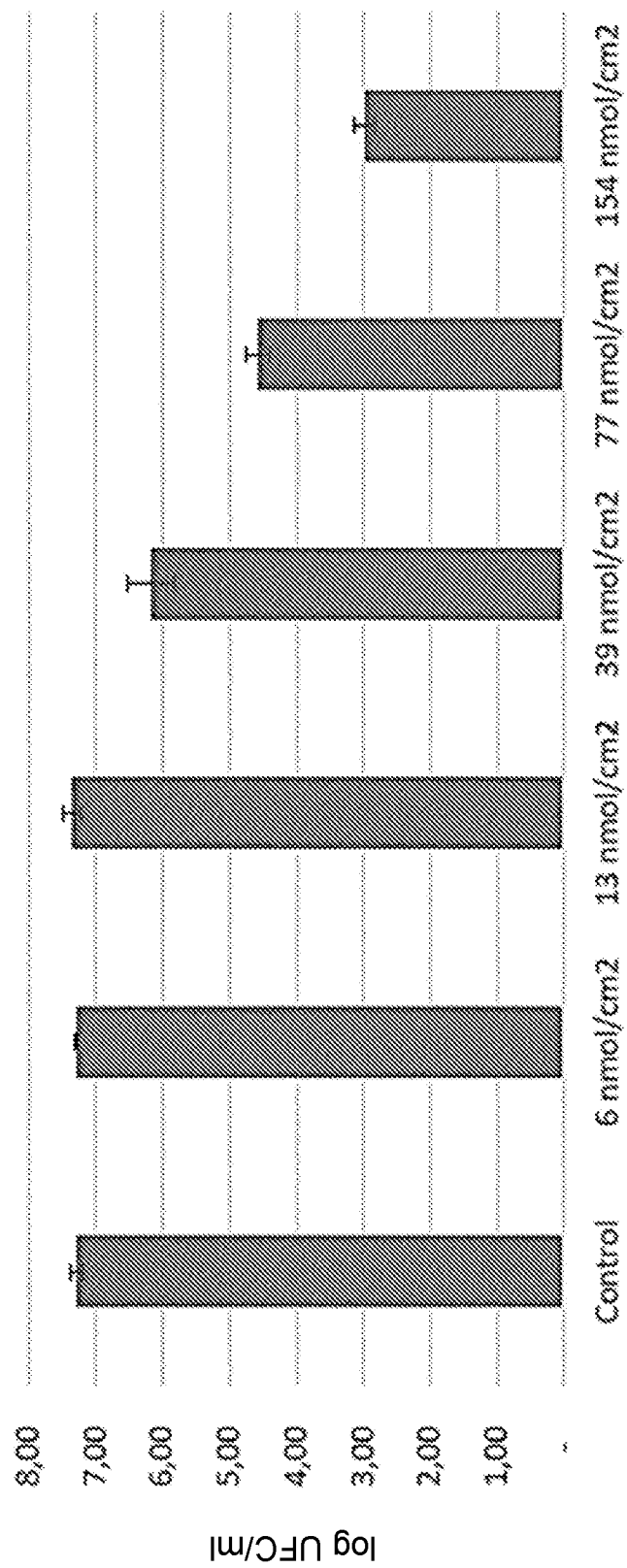
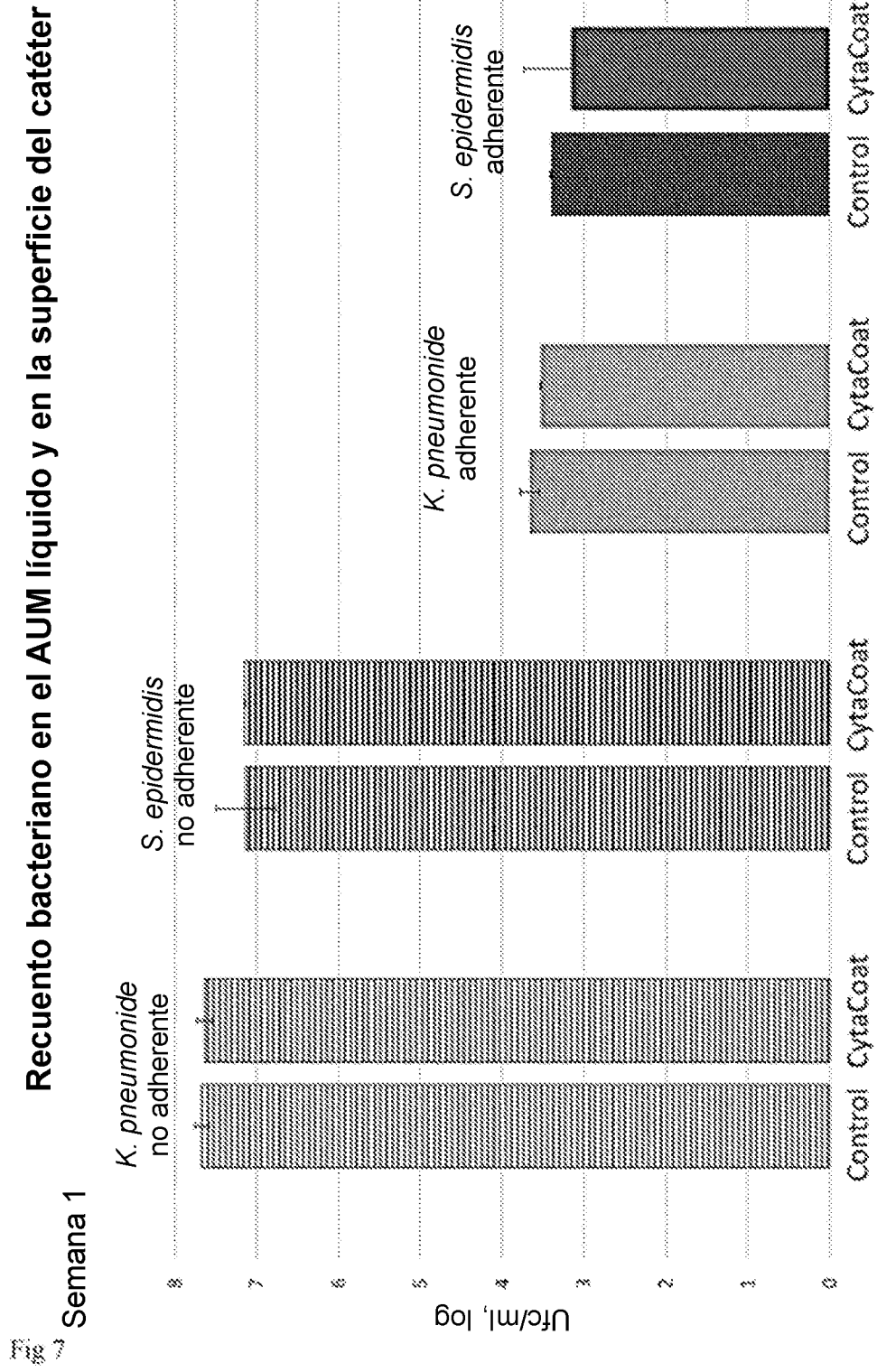


Fig 6.



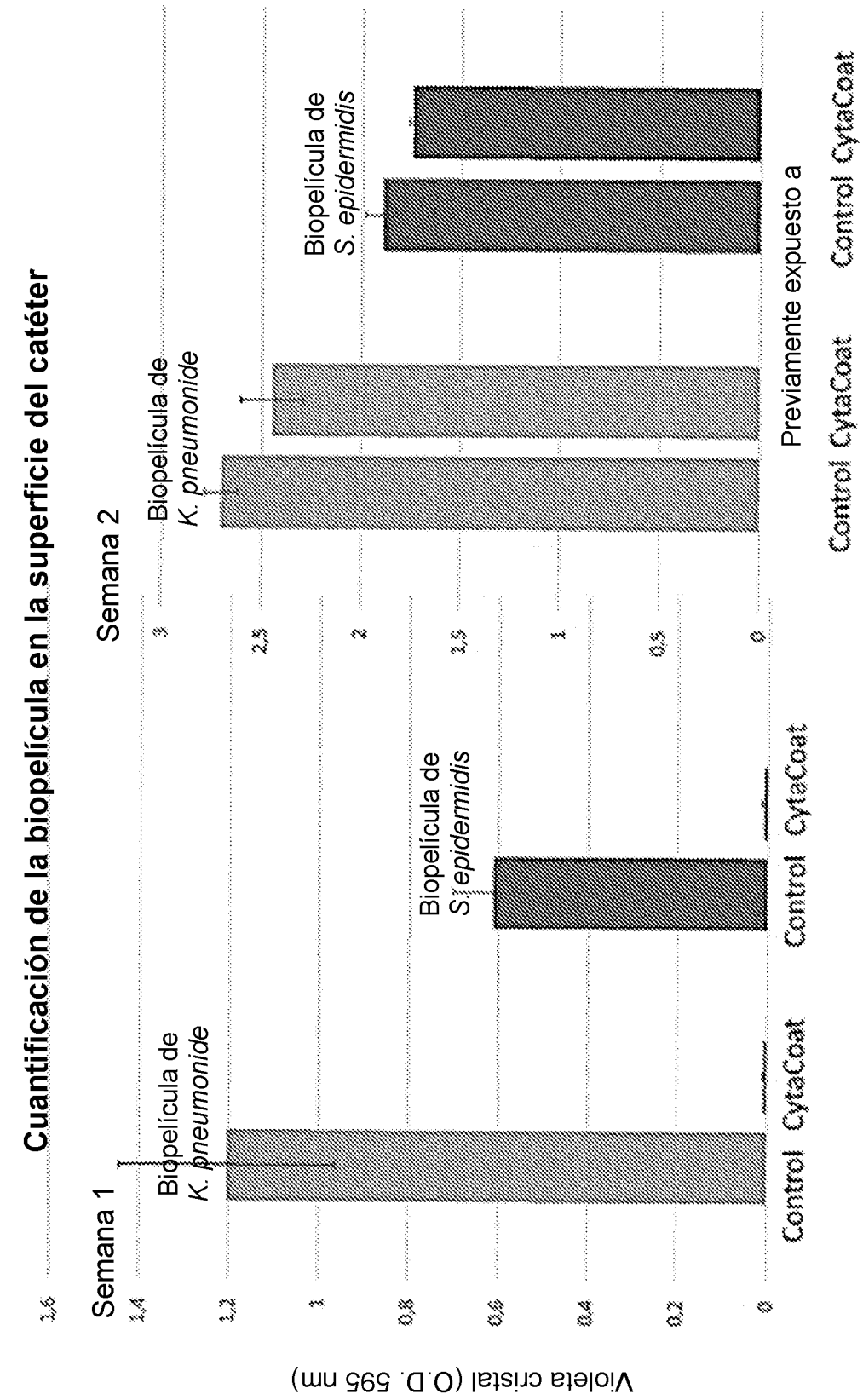


Fig. 8.

