



(10) **DE 11 2018 000 451 B4** 2021.12.02

(12)

Patentschrift

(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2018 000 451.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB2018/052075**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2018/178859**
(86) PCT-Anmeldetag: **27.03.2018**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **04.10.2018**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **10.10.2019**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **02.12.2021**

(51) Int Cl.: **C08J 7/12** (2006.01)
C08J 7/00 (2006.01)
C07D 495/04 (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 29/08 (2006.01)
C09D 5/14 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität:
15/474,330 **30.03.2017** **US**

(73) Patentinhaber:
**Institute of Bioengineering and Nanotechnology,
Singapore, SG; International Business Machines
Corporation, Armonk, NY, US**

(74) Vertreter:
**Richardt Patentanwälte PartG mbB, 65185
Wiesbaden, DE**

(72) Erfinder:
**Cahan, Amos, Yorktown Heights, N.Y., US;
Hedrick, James, San Jose, Calif., US; Fevre,
Mareva, San Jose, CA, US; van Kessel, Theodore,**

**Yorktown Heights, N.Y., US; Hsueh, Pei-Yun,
Yorktown Heights, N.Y., US; Deligianni, Hariklia,
Yorktown Heights, N.Y., US; Wojtecki, Rudy J.,
San Jose, Calif., US; Park, Nathaniel, San Jose,
CA, US; Yang, Yi Yan, Singapore, SG; Ding, Xin,
Singapore, SG; Liang, Zhen Chang, Singapore,
SG**

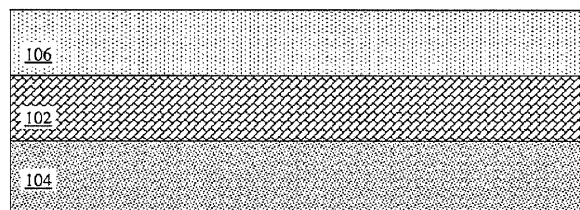
(56) Ermittelter Stand der Technik:

US	2003 / 0 194 504	A1
WO	2008/ 106 194	A1
WO	2014/ 152 423	A1

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung einer vernetzten Polyethylenimin-Beschichtung und Verwendung einer vernetzten Polyethylenimin-Beschichtung**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Herstellung einer vernetzten verzweigten-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtung, wobei das Verfahren aufweist:
Bilden einer ersten BPEI-Schicht, wobei das Bilden der ersten BPEI-Schicht Funktionalisieren der ersten BPEI-Schicht
- mit $\text{NH}_2\text{-PEG}_{4k}\text{-NH}_2$ und negativ geladener Glutaminsäure, oder
- mit $\text{NH}_2\text{-PEG}_{4k}\text{-NH}_2$ und negativ geladener Asparaginsäure, oder
- mit $\text{NH}_2\text{-PEG}_{4k}\text{-NH}_2$ und negativ geladenem Carboxylat aufweist;
Bilden einer ersten Glyoxalschicht auf einer Oberfläche der ersten BPEI-Schicht; und
Härten der ersten BPEI-Schicht und der ersten Glyoxalschicht.

100



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein antibakterielle Beschichtungen zum Verhindern und Behandeln von Bakterien- und Mikroorganismenkoloniebildung, Biofilmentstehung und Infektion in Verbindung mit einer implantierbaren medizinischen Vorrichtung. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung chemisch modifizierter und vernetzter verzweigtes-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtungen (BPEI = „branched polyethylenimine“). Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der hergestellten vernetzten verzweigtes-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtung zum Beschichten einer implantierbaren medizinischen Vorrichtung oder eines Substrates.

[0002] Die Anhäufung von Mikroorganismen auf benetzten Oberflächen, d.h. Biobewuchs, ist ein allgegenwärtiges Materialproblem bei einem weiten Bereich von Anwendungen, wie z.B. bei medizinischen Vorrichtungen, Schiffsinstrumenten, Lebensmittelverarbeitung und sogar Haushaltsabflüssen. Im Allgemeinen lösen Bakterien Biobewuchs über die Entstehung von Biofilmen aus, die aus hochgeordneten anhaftenden Kolonien bestehen, meist innerhalb einer selbsterzeugten Matrix aus extrazellulärem Polymerstoff.

[0003] Die Verwendung implantierbarer Vorrichtungen (wie z.B. Gelenkprothesen, Herzklappen, künstliche Herzen, Gefäßstents und -transplantate, Herzschrittmacher und Defibrillatoren, Nervenstimulationsvorrichtungen, Magenschrittmacher, Gefäßkatheter und Ports (z.B. Port-A-Cath)) nimmt zu, und als Folge fortgeschrittener Therapeutika auch die Zahl von immunsupprimierten Patienten. Infektion stellt für implantierte medizinische Vorrichtungen ein Problem dar. Die Oberflächen implantierter Materialien und Vorrichtungen stellen immunsupprimierte lokale Bereiche dar, in denen Bakterienkoloniebildung und nachfolgende Biofilmentstehung schwer zu diagnostizieren und zu behandeln sind. Biofilme sind aufgrund ihrer Behandlungsresistenz, der potentiellen Freisetzung schädlicher Toxine und der Leichtigkeit der Verbreitung von Mikroorganismen die Hauptursache von persistenten Infektionen, die zu Funktionsstörungen von implantierbaren Vorrichtungen, auf denen sie sich entwickeln (z.B. Katheterokklusion), oder zum Aussäen septischer Embolien an entfernte Orte führen können.

[0004] Oft sind extreme Maßnahmen wie das Entfernen der infizierten implantierten Vorrichtung aus dem Körper des Patienten die einzige Managementoption, die durchgeführt werden kann. Obwohl Desinfektionsverfahren und vorbeugende Antibiotikabehandlung eingesetzt werden, um die Koloniebildung während Handhabungen zu verhindern, ist diese Vorgehensweise nicht zu 100% wirksam, um perioperative Bakterienkoloniebildung zu verhindern. Ferner besteht das Risiko von Bakterienkoloniebildung an einer Gelenkprothese auch lange nach ihrer Implantation. Beispielsweise beträgt bei *S. aureus* bacteremia das Risiko der Koloniebildung auf einer Gelenkprothese beinahe 25 %.

[0005] Antibiotikabehandlungen zur Beseitigung von Kolonien und Infektion in Verbindung mit implantierbaren Stoffen und Vorrichtungen sind in ihrem Vermögen zum Beseitigen von Bakterien und Pilzen, die bei diesen Vorgängen beteiligt sind, beschränkt. Dafür gibt es mehrere Gründe, einschließlich einer verringerten Antibiotikakonzentration tief im Inneren des Biofilms durch beschränkte Diffusion, einer Unfähigkeit von Antibiotika im Allgemeinen, „die letzten“ Pathogenzellen zu beseitigen (was gewöhnlich von dem Immunsystem durchgeführt wird, das aber in einer Situation mit implantierten Vorrichtungen nicht gut arbeitet), und der Fähigkeit von Mikroorganismen, zu persistieren, d.h. metabolisch inaktiv und damit funktionell vergleichsweise resistent gegen Antibiotika zu werden. Durch Antibiotikaresistenz wird die Behandlung von Infektionen in Verbindung mit Vorrichtungen noch schwieriger. Tatsächlich wird Antibiotikaresistenz häufig bei Mikroorganismen beobachtet, die Infektionen in Verbindung mit Vorrichtungen verursachen (z.B. Enterococci, Staphylococci).

[0006] Folglich wurden in den letzten Jahren beträchtliche Anstrengungen zur Entwicklung antibakterieller Oberflächen unternommen. Derartige Oberflächen können in zwei Kategorien eingeteilt werden: (i) bewuchshemmende Oberflächen, die das Anhaften von Mikroorganismen verhindern, und (ii) bakterizide Oberflächen, die die Abtötung von Bakterien auslösen. Zu typischen Strategien zur Entwicklung antibakterieller Oberflächen gehören supramolekulare (nichtkovalente) Beschichtung der Oberfläche und Modifikation der Oberfläche (d.h. chemische Modifikation oder Strukturierung). Bewuchshemmende Eigenschaften können durch Einverleiben von α,ω -Diamino-funktionalisiertem Poly(ethylenglycol) (PEG, Molmasse 4.600 g/mol) zum Erhöhen der Hydrophilie zum Verhindern von Bakterienanhaftung erzielt werden, während bakterizide Eigenschaften durch Funktionalisierung mit freigebbaren Bakterien-abtötenden Stoffen, wie z.B. Silber-Nanopartikel (Ag-NPs) und Antibiotika, oder durch Dekoration mit kontakttötenden bakteriziden Einheiten, wie z.B. quaternären Ammoniumsalzen, erzielt werden können. Aktuelle Technologien haben aber die Nachteile einer schlechten antibakteriellen Langzeitwirkung und schlechten Stabilität, der unerwünschten Entwicklung bakterieller Resistenz oder einer beschränkten Skalierbarkeit auf einen industriellen Rahmen.

[0007] Die US 2003/0194504 A1 offenbart ein Verfahren zur Beschichtung einer Polymeroberfläche, wobei zuerst eine Polyaminkomponente und anschließend ein Crosslinker aufgetragen wird. Die US 2003/0194504 A1 lehrt für die Polyaminkomponente verzweigtes Polyethylenamin und für den Crosslinker diverse Aldehyde wie Glutaraldehyd. Weiterer relevanter Stand der Technik wird durch die WO 2014/152423 A1 und die WO 2008/106194 A1 gelehrt.

KURZDARSTELLUNG

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung chemisch modifizierter und vernetzter verzweigtes-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtungen und die Verwendung der hergestellten vernetzten verzweigtes-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtung zum Beschichten einer implantierbaren medizinischen Vorrichtung oder eines Substrates.

[0009] Bei manchen Ausführungsformen wird BPEI als Träger zum Anhaften hydrophober oder hydrophiler Einheiten verwendet, um die antimikrobiellen/bewuchshemmenden Eigenschaften des fertigen Materials zu verbessern. Wässrige Lösungen von BPEI und Glyoxal werden aufeinanderfolgend auf Substrate gesprüht und ergeben nach Härten eine vernetzte Beschichtung, die den Vorteil einer vielseitigen Technologieplattform für die wirtschaftliche und in großem Maßstab angelegte Anwendung antimikrobieller Materialien bei medizinischen Vorrichtungen bietet.

[0010] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird das BPEI mit Materialien modifiziert, die eine negative elektrische Oberflächenladung aufweisen. Eine auf diese Weise modifizierte Beschichtung stößt Bakterien ab, die andernfalls an der Oberfläche einer implantierbaren Vorrichtung haften würden. Die gleiche Technologie kann verwendet werden, um Koloniebildung auf medizinischen Vorrichtungen, wie z.B. Endoskopen, Laparoskopien, Endoskopen, und Oberflächen des Gesundheitsversorgungssystems (z.B. in der Patientenumgebung) zu verhindern.

[0011] Bei einer oder mehreren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer vernetzten BPEI-Beschichtung bereitgestellt. Das Verfahren weist das Bilden einer ersten BPEI-Schicht auf einem Substrat auf. Eine erste Glyoxalschicht wird auf einer Oberfläche der ersten BPEI-Schicht gebildet. Die erste BPEI-Schicht und die erste Glyoxalschicht werden bei einer zum Bilden der vernetzten BPEI-Beschichtung geeigneten Temperatur gehärtet. Die Beschichtung bietet den technischen Vorteil einer vielseitigen Technologieplattform für die wirtschaftliche und auf großem Maßstab angelegte Anwendung von bewuchshemmenden und bakteriziden Materialien für die Oberfläche von implantierbaren und nichtimplantierbaren medizinischen Vorrichtungen.

[0012] Die erste BPEI-Schicht kann mit superhydrophoben Einheiten, superhydrophilen Einheiten, negativ geladenen Einheiten oder einer Kombination der Genannten modifiziert werden, um den technischen Nutzen einer Beschichtung mit verbesserten bewuchshemmenden Eigenschaften zu erzielen. Die erste BPEI-Schicht kann mit kontakttötenden bakteriziden Einheiten modifiziert werden, um den technischen Nutzen einer Beschichtung mit verbesserten bakteriziden Eigenschaften zu erzielen.

[0013] Die hergestellte vernetzte verzweigtes-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtung der vorliegenden Erfindung wird für eine Vorrichtung zum Verhindern und Behandeln von Bakterien- und Mikroorganismenkoloniebildung, Biofilmentstehung und Infektion bereitgestellt. Die Vorrichtung weist eine implantierbare medizinische Vorrichtung und eine Glyoxal-vernetzte BPEI-Beschichtung auf, die auf einer Oberfläche der implantierbaren medizinischen Vorrichtung gebildet ist. Amine der Glyoxal-vernetzten BPEI-Beschichtung sind kovalent an superhydrophobe Einheiten oder negativ geladene Einheiten gebunden, um den technischen Nutzen einer Beschichtung mit verbesserten bewuchshemmenden Eigenschaften bereitzustellen.

[0014] Implantierbare medizinische Vorrichtungen, auf die eine Beschichtung gemäß der vorliegenden Erfindung aufgebracht werden können, schließen eine Gelenkprothese, eine Gefäßleitung, einen Stent oder ein Transplantat, einen Venenfilter, ein Zahnimplantat, ein Cochleaimplantat, ein zur internen Fixierung einer Knochenfraktur verwendetes Metall, einen Harnkatheter, einen ventrikuloperitonealen Shunt, einen Herz- oder Nervenschrittmacher, eine Herzklappe oder eine ventrikuläre Unterstützungsvorrichtung ein, sie sind aber nicht darauf beschränkt.

[0015] Andere Vorteile und Einsatzmöglichkeiten der Erfindung werden aus der nachstehenden Beschreibung in Verbindung mit den begleitenden Zeichnungen, die Ausführungsformen und Erscheinungsformen der vorliegenden Erfindung zeigen, deutlich werden.

Figurenliste

[0016] Nun werden Ausführungsformen der Erfindung lediglich beispielhaft mit Bezug auf die begleitenden Zeichnungen beschrieben, wobei:

Fig. 1 eine Querschnittansicht einer Struktur mit einer auf einem Substrat gebildeten ersten BPEI-Schicht bei einem Zwischenschritt eines Verfahrens zur Herstellung einer BPEI-Beschichtung gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellt;

Fig. 2 eine Querschnittansicht der Struktur nach Härten der ersten BPEI-Schicht und einer ersten Glyoxalschicht zum Bilden einer homogenen und Glyoxal-vernetzten Beschichtung bei einem Zwischenschritt eines Verfahrens zur Herstellung einer BPEI-Beschichtung gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellt;

Fig. 3 Differentialscanningkalorimetrie(DSC)-Spuren von homogenen und Glyoxal-vernetzten Beschichtungen darstellt, die gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gebildet sind;

Fig. 4 zeigt eine nicht zur Erfindung gehörende, mit einer negativ geladenen Beschichtung beschichtete Hüftgelenksprothese bei einem Zwischenschritt eines Verfahrens zur Herstellung einer implantierbaren medizinischen Vorrichtung mit einer negativ geladenen Oberfläche.

Fig. 5 Ein(1)-Tag-Inkubations-XTT-Tests (A, B) für *S. aureus* (SA) und *P. aeruginosa* (PA), aufgebracht auf Glas (Kontrolle) und gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung hergestellte Beschichtungen auf PEI-Basis, darstellt; und

Fig. 6 einen Sieben(7)-Tage-SA-Inkubations-XTT-Test (A), aufgebracht auf Glas (Kontrolle) und gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung hergestellte Beschichtungen auf PEI-Basis, darstellt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG

[0017] Hierin werden verschiedene Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung mit Bezug auf die entsprechenden Zeichnungen beschrieben. Es können alternative Ausführungsformen entwickelt werden, ohne von dem Umfang der Erfindung abzuweichen. Es ist zu beachten, dass in der nachstehenden Beschreibung und in den Zeichnungen verschiedene Anbindungen und Positionsbeziehungen (z.B. über, unter, neben usw.) zwischen Elementen dargelegt werden. Diese Anbindungen und/oder Positionsbeziehungen können, wenn nicht anders angegeben, direkt oder indirekt sein, und die vorliegende Erfindung soll in dieser Hinsicht nicht beschränkend sein. Demgemäß kann sich eine Kopplung von Einheiten auf eine direkte oder eine indirekte Kopplung beziehen, und eine Positionsbeziehung zwischen Einheiten kann eine direkte oder indirekte Positionsbeziehung sein. Als Beispiel einer indirekten Positionsbeziehung schließt die Beschreibung der Herstellung einer Schicht „A“ über einer Schicht „B“ in der vorliegenden Beschreibung Situationen ein, bei denen eine oder mehrere Zwischenschichten (z.B. Schicht „C“) zwischen Schicht „A“ und Schicht „B“ angeordnet ist/sind, sofern die maßgeblichen Eigenschaften und Funktionalitäten der Schicht „A“ und der Schicht „B“ von der/den Zwischenschicht(en) nicht wesentlich verändert werden.

[0018] Die folgenden Definitionen und Abkürzungen sind für die Auslegung der Ansprüche und der Beschreibung zu verwenden. Wie hierin verwendet, sollen die Begriffe „weist auf“, „aufweisend“, „schließt ein“, „einschließlich“, „hat“, „haben“, „enthält“ und „enthalten“ und beliebige andere Variationen davon nicht-ausschließendes Einschließen bedeuten. Beispielsweise ist eine Zusammensetzung, ein Gemisch, ein Verfahren, eine Methode, ein Gegenstand oder eine Vorrichtung, das/die/der eine Gruppe von Elementen aufweist, nicht notwendigerweise auf diese Elemente beschränkt, sondern kann andere Elemente enthalten, die nicht ausdrücklich aufgelistet sind oder der Zusammensetzung, dem Gemisch, dem Verfahren, der Methode, dem Gegenstand oder der Vorrichtung inhärent sind.

[0019] Ferner wird der Begriff „beispielhaft“ hierin in der Bedeutung von „als Beispiel, Fall oder Veranschaulichung dienend“ verwendet. Jede Ausführungsform oder Gestaltung, die hierin als „beispielhaft“ beschrieben wird, ist nicht notwendigerweise als bevorzugt oder vorteilhaft gegenüber anderen Ausführungsformen oder Gestaltungen auszulegen. Die Begriffe „wenigstens ein“ und „eines oder mehrere“ sind so auszulegen, dass sie eine beliebige ganze Zahl, die größer als oder gleich eins ist, einschließen, d.h. eins, zwei, drei, vier und so weiter. Der Begriff „eine Mehrzahl“ soll eine beliebige ganze Zahl, die größer als oder gleich zwei ist, einschließen, d.h. zwei, drei, vier, fünf und so weiter. Der Begriff „Anbindung“ kann eine indirekte „Anbindung“ und eine direkte „Anbindung“ einschließen.

[0020] Ein Verweis in der Beschreibung auf „eine Ausführungsform“, „Ausführungsform“, „ein Ausführungsbeispiel“ usw. bedeutet, dass die beschriebene Ausführungsform eine bestimmte Eigenschaft, Struktur oder ein bestimmtes Merkmal aufweist und jede andere Ausführungsform die/das besondere Eigenschaft, Struktur oder Merkmal aufweisen kann oder auch nicht. Ferner beziehen sich derartige Ausdrücke nicht notwendigerweise auf die gleiche Ausführungsform. Wenn ferner eine bestimmte Eigenschaft, Struktur oder ein bestimmtes Merkmal in Verbindung mit einer Ausführungsform beschrieben wird, wird davon ausgegangen, dass es zum Können eines Fachmanns gehört, die Eigenschaft, Struktur oder das Merkmal mit anderen Ausführungsformen in Verbindung zu bringen, ob sie nun ausdrücklich beschrieben werden oder auch nicht.

[0021] Für die Zwecke der nachstehenden Beschreibung sollen sich die Begriffe „oberes“, „unteres“, „rechts“, „links“, „senkrecht“, „waagrecht“, „oben“, „unten“ und Ableitungen davon auf die beschriebenen Strukturen und Verfahren wie in den Zeichnungsfiguren ausgerichtet beziehen. Die Begriffe „darüber liegend“, „auf“, „darauf“, „angeordnet auf“ oder „darauf angeordnet“ bedeuten, dass ein erstes Element, wie z.B. eine erste Struktur, auf einem zweiten Element, wie z.B. einer zweiten Struktur, angeordnet ist, wobei zwischen dem ersten Element und dem zweiten Element dazwischenliegende Elemente, wie z.B. eine Grenzflächenstruktur, vorhanden sein können. Der Begriff „direkter Kontakt“ bedeutet, dass ein erstes Element, wie z.B. eine erste Struktur, und ein zweites Element, wie z.B. eine zweite Struktur, ohne eine dazwischenliegende leitfähige, isolierende oder halbleitende Schicht an der Grenzfläche der beiden Elemente verbunden sind. Der Begriff „selektiv für“, wie z.B. „ein erstes Element, das für ein zweites Element selektiv ist“, bedeutet, dass ein erstes Element geätzt werden kann und das zweite Element als Ätzstopp wirken kann. Der Begriff „konform“ (z.B. eine konforme Schicht) bedeutet, dass die Dicke der Schicht auf allen Oberflächen im Wesentlichen gleich ist oder dass die Dickenvariation weniger als 15 % der nominellen Dicke der Schicht beträgt.

[0022] Wie hierin verwendet, sollen die Begriffe „etwa“, „im Wesentlichen“, „ungefähr“ und Variationen davon das Fehlermaß einschließen, der mit Messungen der jeweiligen Größe auf der Grundlage der zum Zeitpunkt der Einreichung der Anmeldung verfügbaren Ausrüstung verbunden ist. Beispielsweise kann „etwa“ einen Bereich von $\pm 8\%$ oder 5% oder 2% eines gegebenen Werts einschließen.

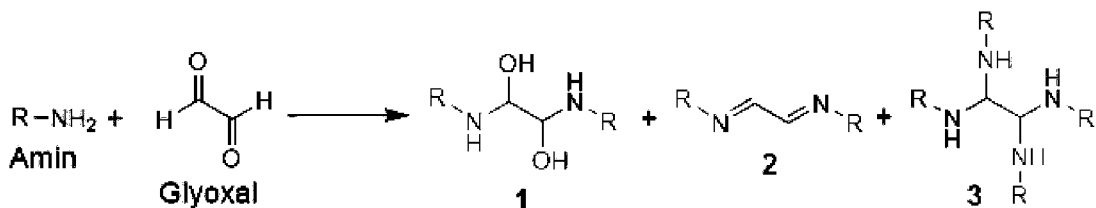
[0023] Wir kommen nun zu einer Beschreibung von Technologien, die für die vorliegende Erfindung spezifischer bedeutend sind, da, wie hierin bereits vorstehend beschrieben, herkömmliche antibakterielle Materialien, die bewuchshemmende oder bakterizide Oberflächen einsetzen, die Nachteile einer schlechten antibakteriellen Langzeitwirkung und einer schlechten Langzeitstabilität, der unerwünschten Entwicklung von bakterieller Resistenz und einer beschränkten Skalierbarkeit auf einen industriellen Rahmen aufweisen. Die Lyse von Bakterienzellen an Biozid-funktionalisierten Oberflächen verringert zwar die Rate der Biofilmentstehung, eine Kombination von sowohl bewuchshemmenden als auch bakteriziden Eigenschaften ist aber wünschenswert, um Langzeitwirkung der Oberflächen zu gewährleisten.

[0024] Unter antimikrobiellen Materialien stellt Polyethylenimin (PEI) eine interessante Alternative zu herkömmlichen Materialien dar. PEI ist im Handel erhältlich, weist tertiäre/sekundäre/primäre Amine auf, die für die Befestigung funktioneller Gruppen verfügbar sind, und es wird angenommen, dass es Bakterien auf eine kontakttötende Weise abtötet (d.h. es ist keine Freisetzung toxischer Einheiten von der Oberfläche erforderlich). Die Möglichkeit der chemischen Modifikation von PEI, um es hydrophober zu machen und/oder permanente Ladungen daran zu befestigen, wurde eingehend untersucht. Durch reduktive Aminierung oder nukleophile Substitution vernetzte PEI-Nanopartikel sind wirkungsvolle antimikrobielle Mittel. Herkömmliche Verfahren zum Einverleiben von antimikrobiellen PEI-Materialien erfordern aber mehrstufige Modifikationsverfahren, erfordern eine harte, nicht umweltfreundliche Verarbeitung und/oder es fehlt ein skalierbares Abscheidungsverfahren, das in industriellem Rahmen anwendbar ist. Ferner weist PEI bei der Verwendung als Beschichtung wie die meisten antimikrobiellen Materialien den Nachteil einer schlechten Langzeitwirksamkeit auf.

[0025] Daher bleibt ein klarer Bedarf an einem umweltfreundlichen Verfahren zum Schützen von Oberflächen und Vorrichtungen über ausgedehnte Zeiträume unter Verwendung einer kombinierten antimikrobiellen/bewuchshemmenden Strategie zum Verhindern der Biofilmentstehung. Die vorliegende Erfindung soll diesen Bedarf und andere erfüllen.

[0026] Nachstehend werden Beispielverfahren zur Herstellung chemisch modifizierter und vernetzter BPEI-Beschichtungen, negativ geladener Polymerbeschichtungen und negativ geladener Oberflächen von Vorrichtungen unter Verwendung einer Elektrode zum Verhindern und Behandeln von Bakterienkoloniebildung, Biofilmentstehung oder Infektion, sowie die so erhaltenen Strukturen gemäß Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ausführlich und mit Bezug auf die begleitenden Zeichnungen in den **Fig. 1-6** beschrieben.

[0027] Bei manchen Ausführungsformen wird verzweigtes PEI (BPEI) unter Verwendung seiner verfügbaren primären Amine, die mit Glyoxal umgesetzt werden, an der Oberfläche eines Substrats vernetzt. Die Reaktion der primären Amine mit Glyoxal kann ein wie in Schema 1 gezeigtes Produktgemisch liefern (d.h. α -Hydroxyamin **1**, Imin **2** und 4/1-Addukte **3**):



[0028] Das Auftreten jedes Produkts hängt von der Beschaffenheit des Amins, der Stöchiometrie, dem Lösungsmittel und der Temperatur ab. Bei Modellstudien bei Raumtemperatur (RT) mit Analyse durch Magnetresonanzspektroskopie (NMR) ist das beobachtete Hauptprodukt das Imin **2**. Allerdings wurden bei Variation der Stöchiometrie Spuren anderer Produkte, die dem Vorhandensein von **3** zugeschrieben werden können, beobachtet. Ferner führt Mischen von PEG mit 0,5 Äq. Glyoxal in N-Methylpyrrolidon (NMP) zum Gelieren des Reaktionsgemischs nach etwa vier (4) Stunden, ein Hinweis auf die Entstehung von **3**, das vermutlich in dem Netzwerk kinetisch gelöscht wird.

[0029] Bei manchen Ausführungsformen werden sowohl BPEI als auch Glyoxal aus Wasser abgeschieden. Dieser Ansatz ermöglicht vorteilhaft ein umweltfreundlicheres Verfahren. Dabei ist es sehr interessant, dass die Reaktion von BPEI mit Glyoxal sehr schnell ist und zu sofortiger Gelierung des Reaktionsmediums führt, wenn wässrige Lösungen von BPEI mit einer Konzentration von höher als etwa 25 Gewichtsprozent und Glyoxal mit einer Konzentration von höher als etwa 5 Gewichtsprozent gemischt werden. Unter Einsatz dieser schnellen Gelierung kann ein Schicht-auf-Schicht-Verfahren durchgeführt werden.

[0030] Fig. 1 zeigt eine Querschnittsansicht einer Struktur **100** mit einer ersten BPEI-Schicht **102**, die auf einem Substrat **104** gebildet ist, während eines Zwischenschritts eines Verfahrens zur Herstellung einer BPEI-Beschichtung gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen. Die BPEI-Schicht **102** ist ausreichend viskos, um eine gute Bedeckung der Substratoberfläche zu ermöglichen. Auf einer Oberfläche der ersten BPEI-Schicht **102** wird eine erste Glyoxalschicht **106** gebildet. Die erste BPEI-Schicht **102** und die erste Glyoxalschicht **106** können unter Verwendung eines beliebigen geeigneten Verfahrens, wie z.B. Aufbringen durch Tauchbeschichtung oder Sprühbeschichtung, auf dem Substrat **104** gebildet oder abgeschieden werden. Bei manchen Ausführungsformen werden die erste BPEI-Schicht **102** und die erste Glyoxalschicht **106** aufeinanderfolgend aus Düsen, die in einem Abstand von 15 Zentimeter über dem Substrat **104** angeordnet sind, mit einem Druck von etwa 25 psi auf das Substrat **104** (z.B. APTES-funktionalisiertes Glassubstrat) gesprüht.

[0031] Auf der Struktur **100** können auf ähnliche Weise zusätzliche abwechselnde Schichten von BPEI und Glyoxal gebildet werden. Die Gesamtzahl der aufgetragenen Schichten kann abhängig von der gewünschten Dicke der fertigen Beschichtung ausgewählt werden. Bei manchen Ausführungsformen ist die Struktur **100** aus einer einzigen Schicht von BPEI und Glyoxal gebildet (insgesamt 2 Schichten). Bei manchen Ausführungsformen werden vier (4) oder neun (9) Schichten verwendet, es liegen aber auch andere Dicken (und damit Gesamtzahlen von Schichten) im Umfang der Erfindung. Bei manchen Ausführungsformen kann, abhängig von der Konzentration der BPEI-Schichten, der Konzentration der Glyoxalschichten und der Temperatur (z.B. für Lösungen mit mehr als etwa 25 Gew.-% BPEI und 5 Gew.-% Glyoxal bei einer Temperatur von etwa 20 Grad Celsius), sofortige Gelierung beobachtet werden.

[0032] Bei manchen Ausführungsformen werden die BPEI-Schichten (z.B. erste BPEI-Schicht **102**) und die Glyoxalschichten (z.B. erste Glyoxalschicht **106**) aus Sprühpistolen mit 22-ml-Vorratsbehälter auf das Substrat **104** aufgebracht. Bei manchen Ausführungsformen wird eine 2,5 Gew.-% Glyoxallösung in Wasser in einen 22-ml-Vorratsbehälter einer ersten Sprühpistole überführt und PEI (1,8 k Molmasse mit 0,31 mmol oder 3,19 mmol -NH₂-Einheiten) in 6,8 g MilliQ-Wasser wird in einen 22-ml-Vorratsbehälter einer zweiten Sprühpistole überführt. Bei manchen Ausführungsformen kann das Substrat **104** nach dem Sprühbeschichtungsvorgang zum Härten auf eine Heizplatte überführt werden.

[0033] Fig. 2 zeigt eine Querschnittsansicht der Struktur **100** nach Härten der ersten BPEI-Schicht **102** und der ersten Glyoxalschicht **106**, um eine homogene und Glyoxal-vernetzte Beschichtung **200** (nachstehend Beschichtung **200**) zu bilden, während eines Zwischenschritts eines Verfahrens zur Herstellung einer BPEI-

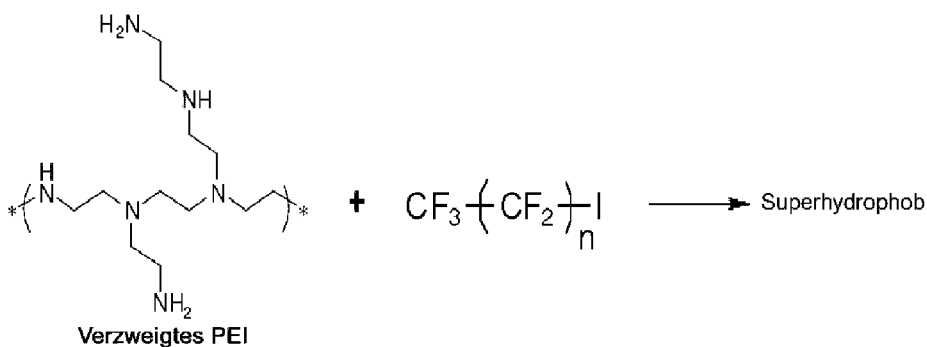
Beschichtung gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen. Bei manchen Ausführungsformen werden die erste BPEI-Schicht **102** und die erste Glyoxalschicht **106** etwa 1 Stunde bei einer Temperatur von etwa 30 Grad Celsius gehärtet. Bei manchen Ausführungsformen werden die erste BPEI-Schicht **102** und die erste Glyoxalschicht **106** bei einer allmählich von etwa 30 bis 120 Grad Celsius zunehmenden Temperatur über einen Zeitraum von etwa 1 Stunde gehärtet. Bei manchen Ausführungsformen werden die erste BPEI-Schicht **102** und die erste Glyoxalschicht **106** etwa 1 Stunde bei einer Temperatur von etwa 120 Grad Celsius gehärtet. Bei manchen Ausführungsformen wird zum Härten eine dreistufige Wärmebehandlung verwendet: (1) eine erste Härtingsstufe bei einer Temperatur von 30 Grad Celsius für 1 Stunde; (2) eine zweite Härtingsstufe mit einer Temperatur, die über einen Zeitraum von 1 Stunde allmählich von etwa 30 bis etwa 120 Grad Celsius ansteigt; und (3) eine dritte Härtingsstufe bei einer Temperatur von 120 Grad Celsius für 1 Stunde. Anschließend wird das Substrat **104** auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Härten der Beschichtung **200** ermöglicht das Entfernen von Wasser (und jeglichem Restlösungsmittel) und gewährleistet eine größtmögliche Vernetzungsdichte.

[0034] Die Vernetzungsdichte und die Eigenschaften der fertigen Beschichtung (Glasübergangstemperatur (T_g), Wasserbeständigkeit usw.) können durch Variieren der Menge von Glyoxal gegenüber primären BPEI-Aminen modifiziert werden, wie durch die in **Fig. 3** gezeigten Differentialscanningkalorimetrie(DSC)-Spuren gezeigt wird. Beispielsweise führte Erhöhen der Glyoxalmenge von 0,5 Äq. auf 2 Äq. gegenüber der Menge an primären Aminen eines BPEI mit einer Molmasse von 1.800 g/mol zu einer Erhöhung von T_g von 135 Grad Celsius.

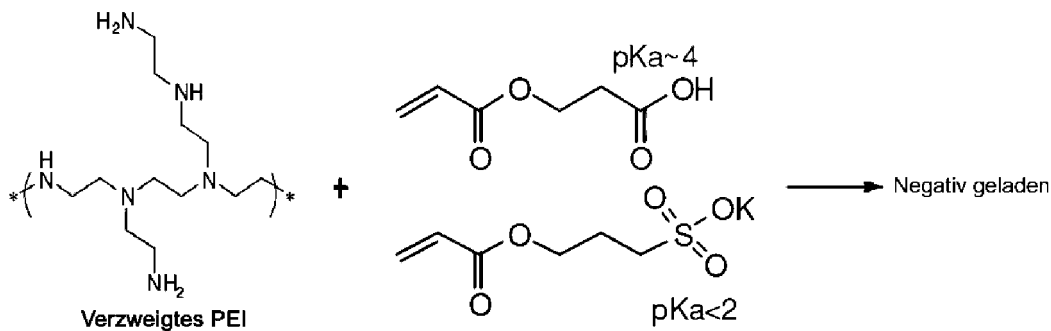
[0035] Die Beschichtung **200** kann selektiv hergestellt oder modifiziert werden, um ihre bewuchshemmenden und bakteriziden Eigenschaften zu verstärken. Bewuchshemmende Eigenschaften können beispielsweise durch kovalente Befestigung von superhydrophoben, superhydrophilen oder negativ geladenen Einheiten an BPEI-Schichten (z.B. der ersten BPEI-Schicht **102**) oder Funktionalisierung damit vor dem oder während des Härten verstärkt werden. Bakterizide Eigenschaften können durch Funktionalisierung der BPEI-Schichten (z.B. der ersten BPEI-Schicht **102**) mit freisetzbaren Bakterien-abtötenden Stoffen, wie z.B. Silber-Nanopartikeln (Ag-NPs) oder Antibiotika, oder durch Einverleiben von kontakttötenden bakteriziden Einheiten, wie z.B. quaternären Ammoniumsalzen (z.B. kontakttötenden kationischen Polymeren), verstärkt werden.

[0036] Bei manchen Ausführungsformen werden Amine der ersten BPEI-Schicht **102** vor dem Härten kovalent an Einheiten gebunden. Diese Reaktion kann zu dem Einverleiben von superhydrophoben (wie in Schema 2 gezeigt) oder negativ geladenen Einheiten (wie in Schema 3 gezeigt) führen.

Schema 2:

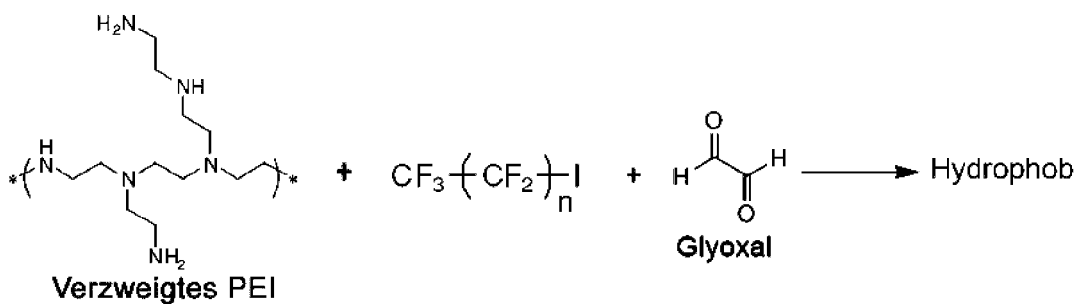


Schema 3:

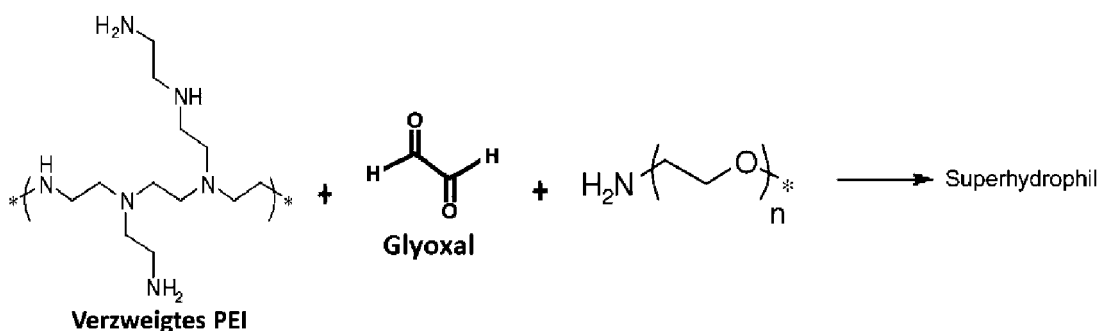


[0037] Bei manchen Ausführungsformen werden hydrophobe, superhydrophile oder negativ geladene Einheiten wie in den Schemen 4, 5 bzw. 6 gezeigt über die Reaktion mit Glyoxal in die Beschichtung **200** einverleibt. Beispielsweise werden in Schema 5 α,ω -Diamino- ($M_n = 4.600$ g/mol) und α -Methoxy, ω -amino ($M_n = 2.000$ g/mol)-funktionalisiertes PEG über die Reaktion mit Glyoxal während des Härstens chemisch in das BPEI/Glyoxal-Gemisch einverleibt.

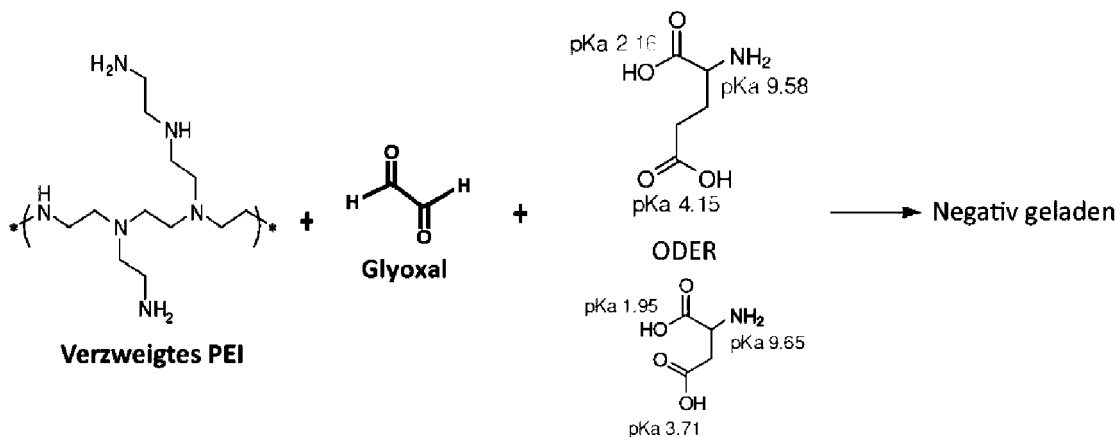
Schema 4:



Schema 5:



Schema 6:



[0038] Bei manchen Ausführungsformen wird die erste BPEI-Schicht **102** mit kationischen Polymereinheiten in einer wässrigen Lösung funktionalisiert. Auf diese Weise wird die Beschichtung **200** mit bakteriziden Eigenschaften modifiziert (d.h. die bakterizide Beschaffenheit der Beschichtung **200** wird durch die Amine der ersten BPEI-Schicht **102** erzielt, die in der wässrigen Lösung teilweise positiv geladen sind). Bei manchen Ausführungsformen können die kationischen Einheiten durch Quaternisierung permanent geladen sein. Bei manchen Ausführungsformen sind die Amine der ersten BPEI-Schicht **102** mit Halogenalkanen oder Halogenarylen quaternisiert.

[0039] Bei manchen Ausführungsformen kann das Haften der Beschichtung **200** an dem Substrat **104** durch Modifizieren des Substrats **104** oder durch Zugabe von haftfördernden Einheiten gefördert werden. Beispielsweise kann bei manchen Ausführungsformen die Oberfläche des Substrats **104** über Kondensation von (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) mit -NH_2 -Einheiten funktionalisiert werden. Die an der Oberfläche des Substrats befestigten Amineinheiten reagieren während des Härungsverfahrens mit Glyoxal. Bei manchen Ausführungsformen werden catecholhaltige Einheiten zu einem oder beiden der BPEI/Glyoxal-Gemische zugegeben, um die Haftung der Beschichtung **200** an dem Substrat **104** zu fördern.

[0040] Fig. 5 zeigt Ein(1)-Tag-Inkubations-XTT-Tests (A, B) für *S. aureus* (SA) bzw. *P. aeruginosa* (PA), aufgebracht auf Glas (Kontrolle) und gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung hergestellte Beschichtungen auf PEI-Basis. Zum Bestimmen der antimikrobiellen/bewuchshemmenden Eigenschaften der Beschichtungen auf PEI-Basis wurden *S. aureus* (SA) und *P. aeruginosa* (PA) ausgewählt, da sie Gram-positive bzw. Gramnegative Bakterien sind, von denen bekannt ist, dass sie für nosokomiale Infektionen verantwortlich sind. Sowohl SA als auch PA waren fähig, auf unmodifizierten Kontroll-Glassubstraten Kolonien zu bilden. Insbesondere wurde nach nur einem (1) Tag Inkubation eine dichte Schicht von SA auf Glasoberflächen nachgewiesen. Die Glassubstrate wurden unter Verwendung bekannter Verfahren vorbereitet. Beispielsweise können 3"x2"-Mikroskop-Objektträgergläser über Nacht in eine Lösung von grenzflächenaktivem Mittel getaucht werden. Anschließend können die Objektträger mit Wasser und mit Ethanol gespült und getrocknet werden. Anschließend können die Objektträger 15 min mit UV/Ozon behandelt werden. Diese sauberen Objektträger können dann 30 Minuten in eine 10 % APTES-Lösung in Ethanol getaucht und vor dem Trocknen gründlich mit Ethanol gespült werden. Begrenzungen aus Aluminiumband (z.B. 80 μm dick) können angebracht werden und die Objektträger können vor der Sprühbeschichtung unter Stickstoff gehalten werden.

[0041] Nach der Beschichtung mit funktionellem PEI/Glyoxal zeigten die meisten Oberflächen eine gewisse bewuchshemmende Aktivität. Beispielsweise verringerte die unmodifizierte BPEI-Beschichtung (BPEI) den Bewuchs mit SA und mit PA wesentlich auf 11 % bzw. 25 % im Vergleich zu Kontroll-Glassubstraten. Die Beschichtung mit PEG-funktionalisiertem BPEI (**1**, BPEI funktionalisiert mit hydrophilem $\text{NH}_2\text{-PEG}_{4,6\text{k}}\text{-NH}_2$ und $\text{mPEG}_{2\text{k}}\text{-NH}_2$) verbesserte die bewuchshemmende Aktivität gegen SA nicht. Dies könnte durch die ähnlichen Oberflächenhydrophilien von PEG/BPEI und unmodifizierten BPEI-Beschichtungen erklärt werden. Ferner zeigte die Beschichtung **1** eine geringere bewuchshemmende Aktivität gegen PA, vermutlich da PEG-Ketten die kationischen Ladungen von BPEI abschirmen und damit die antibakterielle Wirksamkeit von BPEI verringern.

[0042] BPEI-Beschichtungen, die unter Verwendung von negativ geladener/geladenem Glutaminsäure (**2a**, BPEI funktionalisiert mit $\text{NH}_2\text{-PEG}_{4\text{k}}\text{-NH}_2$ /negativ geladene Glutaminsäure), Asparaginsäure (**2b**, BPEI funk-

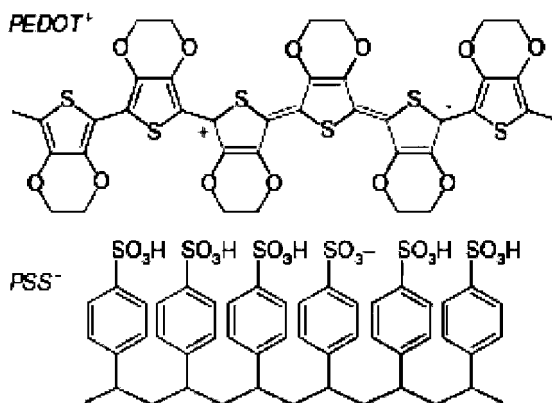
tionalisiert mit $\text{NH}_2\text{-PEG}_{4k}\text{-NH}_2$ /negativ geladene Asparaginsäure) und Carboxylatacrylat (**2c**, BPEI funktionalisiert mit $\text{NH}_2\text{-PEG}_{4k}\text{-NH}_2$ /negativ geladenes Carboxylatacrylat) hergestellt worden sind, sollten die negativ geladenen Bakterien elektrostatisch abstoßen. Es wurde aber gefunden, dass die Beschichtungen **2a** und **2b** eine gleich gute bewuchshemmende Aktivität wie eine unmodifizierte BPEI-Beschichtung zeigten. Obwohl die negativ geladenen Einheiten die Bakterien abstoßen könnten, war die Gesamtladung der Beschichtung verringert, was zu einer Verringerung der antibakteriellen Wirkung von BPEI führen könnte.

[0043] Es wurde gefunden, dass zum Erhöhen der Hydrophobie fluorierte BPEI-Beschichtungen die Oberflächenhydrophobie der Beschichtungen erfolgreich mit Kontaktwinkeln bis zu 76° (3a, BPEI funktionalisiert mit hydrophoben, fluorierten $\text{CF}_3\text{-CF}_2$ -Einheiten) und 73° (3b, BPEI funktionalisiert mit hydrophoben, fluorierten $\text{CF}_3\text{-(CF}_2)_5$ -Einheiten) erhöhen. Allerdings nahm der Bewuchs mit SA und PA auf diesen Beschichtungen im Vergleich zu den unmodifizierten BPEI-Oberflächen zu, vermutlich aufgrund einer Abnahme des Gehalts an kationischen Ladungen nach der teilweisen Substitution der Amine des BPEI zum Anbinden der fluorierten Einheiten.

[0044] Die antimikrobiellen/bewuchshemmenden Langzeitwirkungen von Beschichtungen auf BPEI-Basis, die erfolgversprechende Ergebnisse bei 1-Tag-Inkubationstests zeigten (BPEI, 1, 2a, 2b und 2c, wie in **Fig. 5** gezeigt), wurden durch 7 Tage Inkubation mit SA untersucht. **Fig. 6** zeigt einen Sieben(7)-Tage-SA-Inkubations-XTT-Test (A), aufgebracht auf Glas (Kontrolle) und die Beschichtungen auf PEI-Basis BPEI, 1, 2a, 2b und 2c. Das Wachstumsmedium wurde einmal täglich durch frisches ersetzt. Alle Filme auf BPEI-Basis blieben nach 7 Tagen Inkubation mit SA intakt. Die Ergebnisse von XTT und lebend/tot-Färbung zeigten, dass die Beschichtungen auf BPEI-Basis BPEI, 1, 2a, 2b und 2c nach 7 Tagen ausgezeichnete bewuchshemmende Aktivitäten zeigten, wobei die Bakterienzahlen mit jenen vergleichbar waren, die nach 1 Tag Inkubation gemessen wurden (wie in **Fig. 6** dargestellt), unabhängig von der Modifikationsstrategie.

[0045] Es sind verschiedene Systeme zum Modifizieren der bewuchshemmenden und bakteriziden Eigenschaften der Beschichtung **200** beschrieben worden. Es ist zu beachten, dass diese Systeme für alle verfügbaren Systeme lediglich repräsentativ sind und dass andere, ähnliche Systeme zum Modifizieren der Beschichtung **200** verwendet werden können. Die Langzeitstabilität und -wirksamkeit antimikrobieller Beschichtungen kann durch Abgleichen der Hydrophobie oder Hydrophilie der Beschichtung gegen die elektrostatische Anziehung oder Abstoßung der Beschichtung für lebende/tote Bakterien optimiert werden.

[0046] Bei manchen Ausführungsformen werden negativ geladene Polymerbeschichtungen erzeugt, um Bakterien- und Mikroorganismenkoloniebildung, Biofilmentstehung und Infektion im Zusammenhang einer implantierbaren medizinischen Vorrichtung zu verhindern und zu behandeln. Bei manchen Ausführungsformen wird die Beschichtung **200** durch Funktionalisieren eines im Handel erhältlichen Polymers mit biokompatiblen Materialien, die ein negatives Zeta-Potential aufweisen, hergestellt. Bei manchen Ausführungsformen ist die Beschichtung **200** beispielsweise Hydroxyapatit, der mit negativen Carboxy-COO-Gruppen (z.B. Dodecandisäure) funktionalisiert ist. Bei manchen Ausführungsformen ist die Beschichtung **200** Poly(3,4-ethylendioxythiophen) (PEDOT), das mit Polystyrolsulfonatgruppen funktionalisiert ist. Diese Reaktionen können die in Schema 7 gezeigten Beispielbeschichtungen liefern:



[0047] Bei manchen Ausführungsformen wird eine Oberfläche einer Vorrichtung (d.h. einer implantierbaren medizinischen Vorrichtung) unter Verwendung einer Elektrode negativ aufgeladen, um Bakterien- und Mikroorganismenkoloniebildung, Biofilmentstehung und Infektion zu verhindern und zu behandeln. **Fig. 4** zeigt eine Hüftgelenkprothese **500**, die mit einer negativ geladenen Beschichtung **502** beschichtet ist, bei einem Zwi-

schensschritt eines Verfahrens zur Herstellung einer implantierbaren medizinischen Vorrichtung mit einer negativ geladenen Oberfläche gemäß einer oder mehreren Ausführungsformen. Zur Vereinfachung der Darstellung ist nur eine einzelne medizinische Vorrichtung (z.B. Hüftgelenkprothese **500**) dargestellt. Es ist zu beachten, dass verschiedene medizinische Vorrichtungen auf ähnliche Weise unter Verwendung einer Elektrode negativ aufgeladen werden können. Bei manchen Ausführungsformen ist die medizinische Vorrichtung eine Herzklappenprothese, eine linksventrikuläre Unterstützungsvorrichtung, ein Gefäßstent, Gefäßtransplantat, eine Gelenkprothese, ein Knochenimplantat, ein implantierter Zahn, ein implantierter Schrittmacher, ein Schrittmachergenerator oder -draht, eine intravaskuläre Leitung, ein ventrikuloperitonealer Shunt, ein Harnkatheter, ein Augenimplantat, ein intrakraniales Implantat oder ein subkutanes Implantat.

[0048] Bei manchen Ausführungsformen wird die negative Ladung der Beschichtung **502** durch eine Stromquelle **504** aufrecht gehalten. Die Stromquelle **504** kann eine beliebige geeignete Stromquelle für implantierbare medizinische Vorrichtungen sein, wie z.B. eine Batterie oder ein Mikrokondensator, die über eine Elektrode **506** mit der negativ geladenen Beschichtung **502** verbunden ist. Bei manchen Ausführungsformen kann die Stromquelle in die implantierbare Vorrichtung integriert oder funktionell damit verbunden sein. Bei manchen Ausführungsformen kann die Stromquelle unter Verwendung von Induktion, RFID oder Ultraschall über einen drahtlosen Sender/Empfänger **508** von außerhalb des Körpers des Patienten aufgeladen werden. Bei manchen Ausführungsformen ist der drahtlose Sender/Empfänger **508** funktionell mit einer Steuereinheit **510**, einschließlich eines Digitalcomputers, verbunden. Bei manchen Ausführungsformen kann die negativ geladene Beschichtung **502** aus einem Nanodraht-Netz hergestellt sein, das fähig ist, elektrische Energie (Strom) aus mechanischer Bewegung zu erzeugen. Auf diese Weise lädt Bewegung der negativ geladenen Beschichtung **502** die Stromquelle **504** auf. Bei manchen Ausführungsformen erzeugt ein in der Hüftgelenkprothese **500** eingebetteter mechanischer Energiewandler **512** elektrische Energie (Strom) aus Körperbewegungen und der Stromquelle **504**. Bei manchen Ausführungsformen kann die Steuereinheit **510** drahtlos Daten nach/von außerhalb des Körpers des Patienten senden und empfangen.

[0049] Bei manchen Ausführungsformen wird die negative Ladung der Beschichtung **502** durch das Vorhandensein von Indikatoren einer potentiellen Infektion ausgelöst, wie z.B. einer Veränderung des lokalen pH-Werts (die z.B. eine Folge von mikrobiellem Metabolismus anzeigt) oder eines Anstiegs der Körpertemperatur (der z.B. das Vorhandensein von Fieber anzeigt). Bei manchen Ausführungsformen wird die negative Ladung der Beschichtung **502** für einen bestimmten Zeitraum aufrecht gehalten, wie z.B. einen Zeitraum nach der Implantation, einen Zeitraum nach einer systemischen Infektion oder einen Zeitraum, der von einem Steuersignal festgelegt wird, das über den drahtlosen Sender/Empfänger **508** von einem entfernten Ort (d.h. einem außerhalb des Körpers angeordneten Steuermodul) empfangen wird.

Materialien, Herstellung und Charakterisierung

[0050] Glyoxal (40 Gew.-% in H₂O), Asparaginsäure, Glycolsäure, 2-Carboxyethylacrylat und BPEI (M_n = 10.000 g/mol) wurden von Aldrich bezogen. (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) wurde von Gelest bezogen. BPEI (M_n = 1.800 g/mol) wurde von Jeffamine bezogen. D4000 wurde von Hunstman bezogen. MeO-PEG2k-NH₂ wurde von Polymer Science, Inc., bezogen. Alle Materialien wurden ohne weitere Reinigung verwendet. NH₂-PEG4.6k-NH₂ wurde unter Verwendung bekannter Verfahren hergestellt. *S. aureus* (ATCC Nr. 6538) und *P. aeruginosa* (ATCC Nr. 9027) wurden von ATCC bezogen. Mueller-Hinton-Brühe (MHB) wurde von BD, Singapur, bezogen. XTT-Salz (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) wurde von Sigma Aldrich bezogen. Das LIVE/DEAD BacLight-Bakterienvitalitäts-Kit wurde von ThermoFisher bezogen.

[0051] Glassubstrate wurden vorbereitet, indem 3"-mal-2"-Mikroskop-Objektträgergläser über Nacht in eine Lösung von grenzflächenaktivem Mittel getaucht werden. Anschließend wurden die Objektträger mit Wasser und mit Ethanol gespült und getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger 15 min mit UV/Ozon behandelt. Die sauberen Objektträger wurden 30 Minuten in eine 10 % APTES-Lösung in Ethanol getaucht und vor dem Trocknen gründlich mit Ethanol gespült. Begrenzungen aus Aluminiumband (z.B. 80 µm dick) wurden angebracht und die Objektträger wurden vor der Sprühbeschichtung unter Stickstoff gehalten.

[0052] Thermogravimetrische Analysen (TGA) wurden auf einem Q500 durchgeführt. Die Proben (z.B. 5 bis 7 mg) wurden mit einer Heizrate von 5 Grad Celsius pro min unter einer N₂-Atmosphäre von Raumtemperatur bis 500 Grad Celsius abgetastet. Analysen durch Differentialscanningkalorimetrie (DSC) wurden auf einem TA Instruments Q2000 durchgeführt. Die Proben (z.B. 5 bis 7 mg) wurden mit einer Heizrate von 5 Grad Celsius pro min in geschlossenen Aluminiumtiegel von Raumtemperatur bis 200 Grad Celsius abgetastet. Dynamische mechanische Analysen (DMA) auf einem TA Instruments DMA 2980 unter Verwendung eines

doppelten Auslegers durchgeführt. Die Proben (etwa 12 mal 6 mal 1 mm, auf Metallnetze aufgebracht) wurden mit einer Heizrate von 5 Grad Celsius pro min von -80 Grad Celsius bis 200 Grad Celsius untersucht.

Verfahren zur Herstellung von PEI-Glyoxal-Filmen durch Sprühbeschichtung

[0053] Eine 2,5 Gew.-% Glyoxallösung in Wasser wurde in den 22-ml-Vorratsbehälter einer ersten Sprühpistole überführt. Eine zweite Lösung von 0,563 g PEI_{1.8k} (0,31 mmol oder 3,19 mmol - NH₂-Einheiten) in 6,8 g MilliQ-Wasser wurde in den 22-ml-Vorratsbehälter einer zweiten Sprühpistole überführt. Die Schichten wurden abwechselnd auf ein APTES-funktionalisiertes Glassubstrat gesprüht (beginnend mit der Glyoxallösung), wobei der Abstand zwischen dem Substrat und der Düse etwa 15 cm und der Druck etwa 25 psi betrug, bis die gewünschte Gesamtzahl von Schichten erreicht war (z.B. insgesamt 9 Schichten). Anschließend wurde das Glassubstrat zum Härten auf eine Heizplatte überführt. Es wurde folgende Wärmebehandlung verwendet: 30 Grad Celsius für 1 Stunde, 30 Grad Celsius bis 120 Grad Celsius während 1 Stunde und 120 Grad Celsius für 1 Stunde. Nach dem Härten wurde der Film auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Mit einer Rasierklinge wurde ein Stück des Films von der Oberfläche für die thermische Analyse abgeschabt. Alternativ dazu wurden die gleichen Lösungen auf ein Metallnetz gesprüht und durch DMA analysiert.

Charakterisierung von antimikrobiellen/bewuchshemmenden Eigenschaften

[0054] Die Bakterien *S. aureus* und *P. aeruginosa* (0,5 ml, 10⁵ CFU/ml) in MHB-Medium wurden in einer 48-Well-Platte auf Probenoberflächen (0,5 cm mal 0,5 cm) geimpft. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Proben drei Mal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die antimikrobiellen/bewuchshemmenden Eigenschaften durch XTT-Test und lebend/tot-Bakterienfärbung untersucht. XTT-Salz (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) (50 µl 1 mg/ml) und Menadion (10 µl, 0,4 mM) wurden bei 37 Grad Celsius 4 Stunden mit PBS-gewaschenen Proben inkubiert. Die Absorbanz bei 490 nm wurde durch einen TECAN-Mikroplattenleser aufgezeichnet. Da lebensfähige Bakterienzellen XTT zu orangefarbigem Formazan umwandeln, korreliert die Absorption bei 490 nm mit der metabolischen Aktivität von Bakterien auf Oberflächen. Ein LIVE/DEAD BacLight-Bakterienviabilitäts-Kit wurde zum Färben der Bakterien verwendet, um die Bakterien auf Oberflächen zu visualisieren. Eine Farbstofflösung von Propidiumiodid (das Bakterien mit beschädigter Membran färbt) und SYTO® 9 (das Bakterien mit intakter Membran färbt) wurde vorbereitet, indem 1,5 µl jedes Farbstoffvorrats in 1 ml PBS verdünnt wurde. Die PBS-gewaschenen Proben wurden durch wenigstens 15 Minuten Inkubation mit Farbstofflösung (500 µl) im Dunkeln gefärbt. Die Fluoreszenzbilder wurden unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops Zeiss LSM erhalten. Bei der Untersuchung von antimikrobiellen/bewuchshemmenden Langzeiteigenschaften wurde das bakterielle Wachstumsmedium MHB täglich durch frisches MHB-Medium ersetzt. Der XTT-Test und die lebend/tot-Bakterienfärbung wurden, wie vorstehend ausführlich beschrieben, nach 7 Tagen Inkubation durchgeführt.

[0055] Die Beschreibungen der verschiedenen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wurden zu Zwecken der Veranschaulichung gegeben, sie sind aber nicht als erschöpfend oder auf die beschriebenen Ausführungsformen beschränkt gedacht. Dem Fachmann werden zahlreiche Modifikationen und Variationen naheliegen, ohne von dem Umfang und Geist der Erfindung abzuweichen. Die hierin verwendete Terminologie wurde gewählt, um die Grundgedanken der Ausführungsform, der praktischen Anwendung und der technischen Verbesserung gegenüber Technologien, die auf dem Markt zu finden sind, am besten zu erklären oder um anderen Fachleuten das Verständnis der hierin beschriebenen Ausführungsformen zu ermöglichen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer vernetzten verzweigten-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtung, wobei das Verfahren aufweist:

Bilden einer ersten BPEI-Schicht, wobei das Bilden der ersten BPEI-Schicht Funktionalisieren der ersten BPEI-Schicht

- mit NH₂-PEG_{4k}-NH₂ und negativ geladener Glutaminsäure, oder
- mit NH₂-PEG_{4k}-NH₂ und negativ geladener Asparaginsäure, oder
- mit NH₂-PEG_{4k}-NH₂ und negativ geladenem Carboxylatacrylat aufweist;

Bilden einer ersten Glyoxalschicht auf einer Oberfläche der ersten BPEI-Schicht; und
Härten der ersten BPEI-Schicht und der ersten Glyoxalschicht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, ferner aufweisend Bilden einer Mehrzahl von abwechselnden BPEI-Schichten und Glyoxalschichten auf einer Oberfläche der ersten Glyoxalschicht vor dem Härten.

3. Verfahren nach Anspruch 1, ferner aufweisend Modifizieren der ersten BPEI-Schicht mit hydrophoben Einheiten, superhydrophilen Einheiten, negativ geladenen Einheiten oder einer Kombination der Genannten.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Bilden der ersten BPEI-Schicht Aufbringen der ersten BPEI-Schicht auf ein Substrat aus einer Düse, die mit einem Abstand von 15 Zentimeter über dem Substrat angeordnet ist, mit einem Druck von 1,72 bar (25 psi) aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, ferner aufweisend Modifizieren der ersten BPEI-Schicht mit kontakttötenden bakteriziden Einheiten.
6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die kontakttötenden bakteriziden Einheiten quaternäre Ammoniumsalze aufweisen.
7. Verfahren nach Anspruch 1, ferner aufweisend Modifizieren der ersten BPEI-Schicht mit kationischen Polymereinheiten.
8. Verfahren nach Anspruch 7, ferner aufweisend Quaternisieren von Aminen der ersten BPEI-Schicht.
9. Verwendung einer nach einem der Ansprüche 1-8 hergestellten vernetzten verzweigten-Polyethylenimin (BPEI)-Beschichtung zum Beschichten einer implantierbaren medizinischen Vorrichtung, wobei die Glyoxal-vernetzte verzweigten-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtung auf einer Oberfläche der implantierbaren medizinischen Vorrichtung gebildet ist und wobei Amine der BPEI-Beschichtung kovalent an superhydrophobe Einheiten oder negativ geladene Einheiten gebunden sind.
10. Verwendung einer nach Anspruch 3 hergestellten vernetzten verzweigten-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtung zum Beschichten eines Substrats, wobei die Glyoxal-vernetzte verzweigten-Polyethylenimin(BPEI)-Beschichtung auf einer Oberfläche des Substrats gebildet ist und wobei Amine der Glyoxal-vernetzten BPEI-Beschichtung kovalent an hydrophobe Einheiten oder negativ geladene Einheiten gebunden sind.

Es folgen 6 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

100

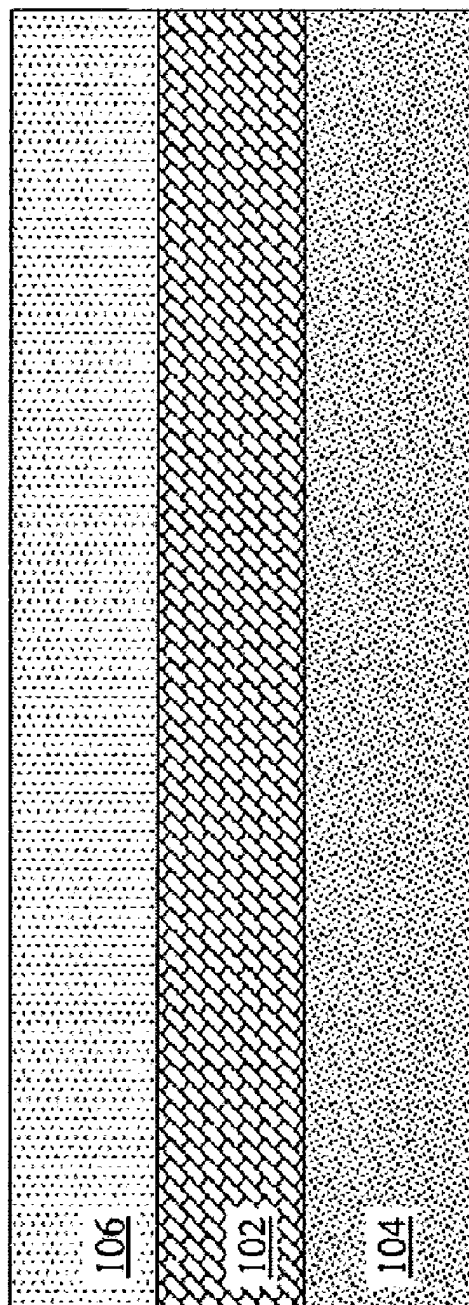


Fig. 1

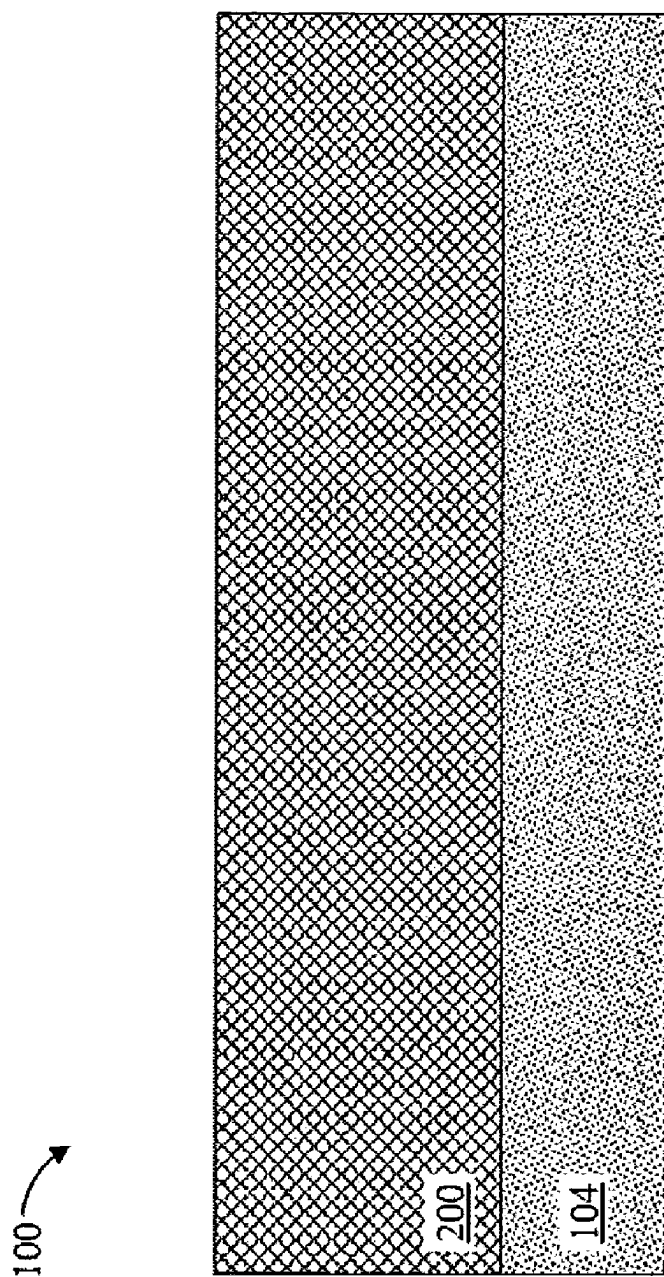


Fig. 2

DSC-Spuren von BPEI(MW 1,8k)- und Glyoxalbeschichtungen
nach 1 h Härten bei 120 °C

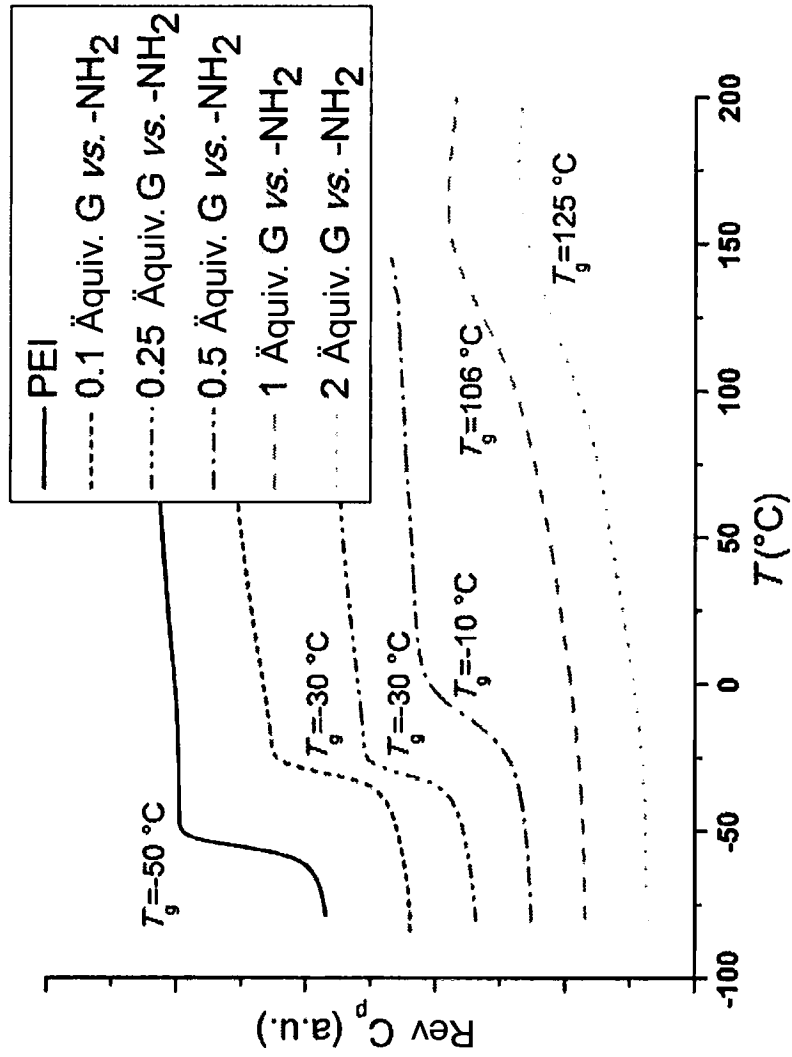


Fig. 3

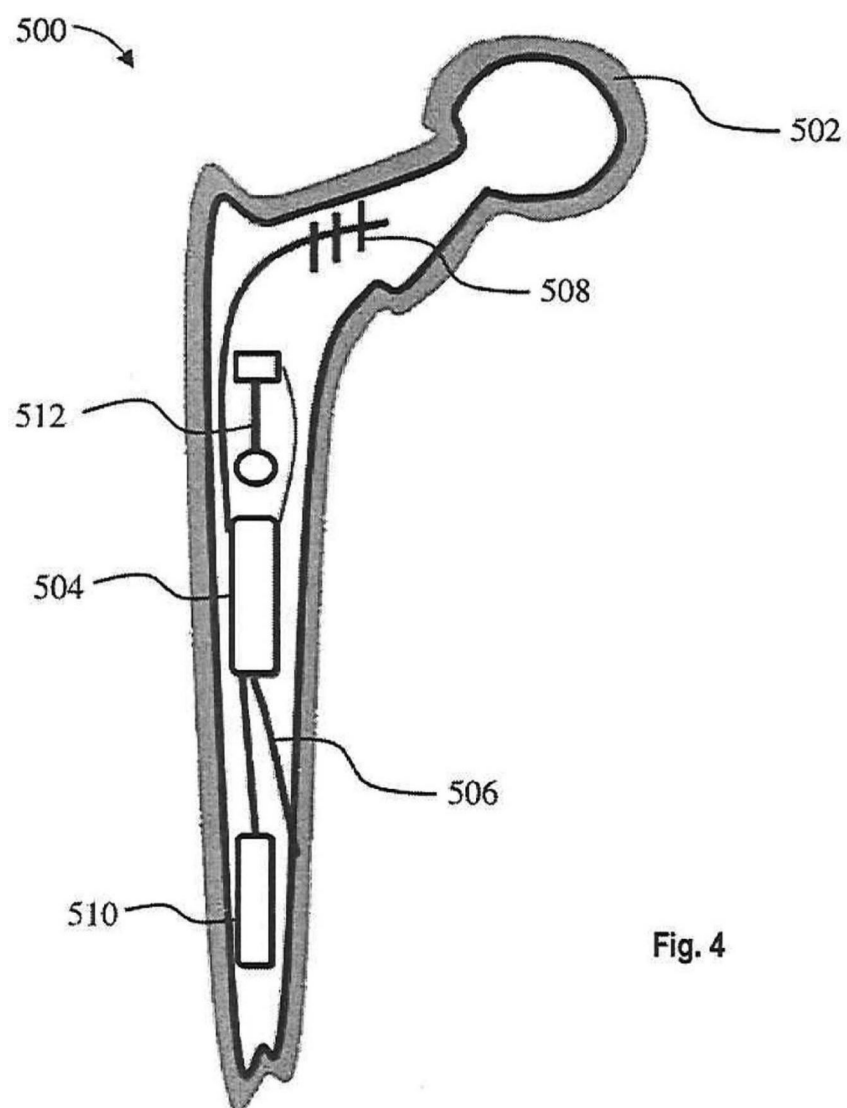


Fig. 4

Antimikrobielle und bewuchshemmende Eigenschaften von Beschichtungen auf PEI-Basis gegen *S. aureus* (SA) und *P. aeruginosa* (PA), gekennzeichnet durch einen 1-Tag-XTT-Test (A, B)

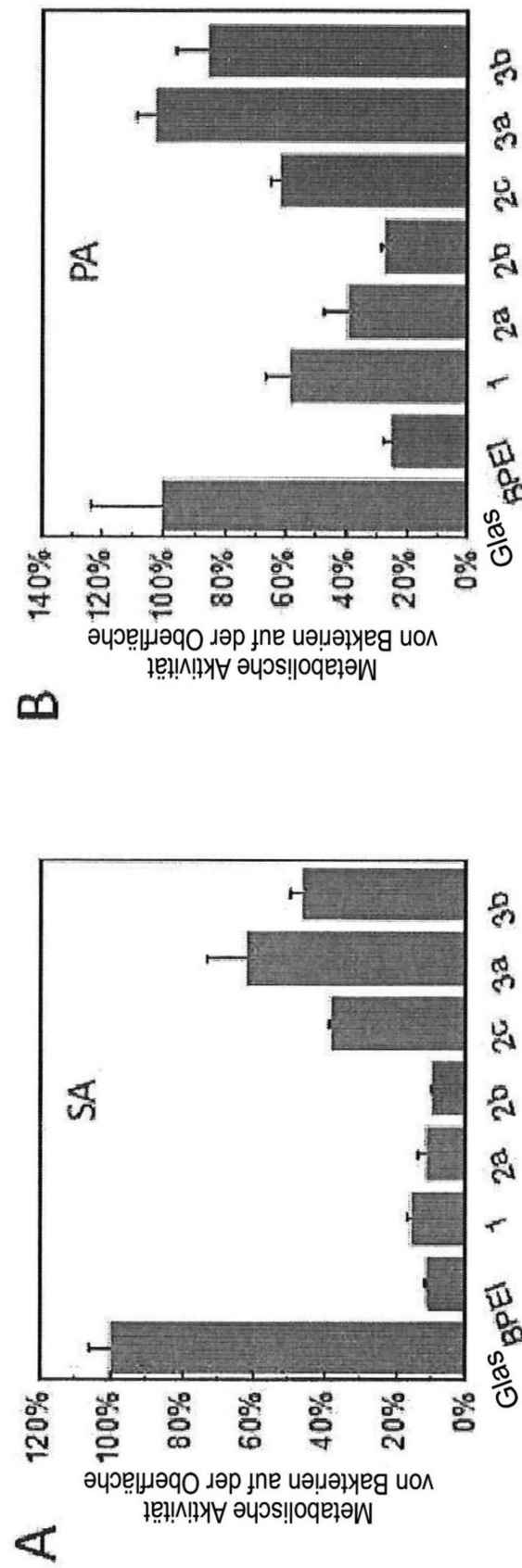


Fig. 5

Antimikrobielle und bewuchshemmende Eigenschaften von Beschichtungen
auf PEI-Basis gegen *S. aureus* (SA), gekennzeichnet durch einen XTT-Test (A)

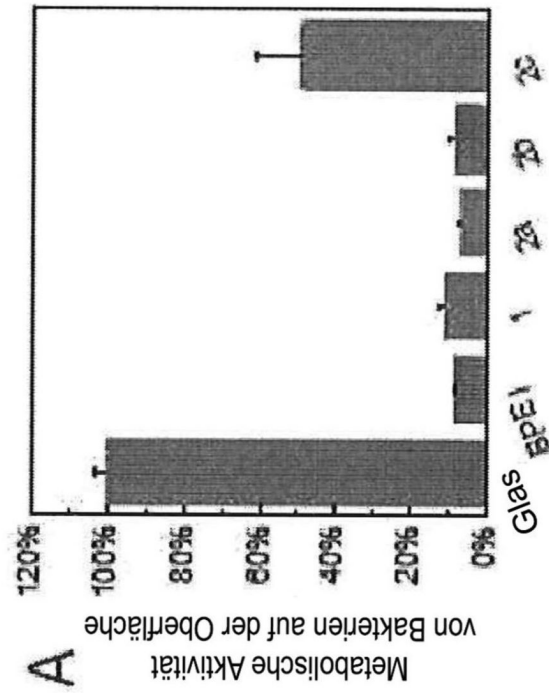


Fig. 6