

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 373**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

A61C 8/00 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2010 PCT/SE2010/050560**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010 WO10138062**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2010 E 10780883 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2435102**

54 Título: **Películas de proteína de múltiples capas, métodos de preparación y dispositivos de suministro de fármacos e implantes biomédicos que emplean las películas**

30 Prioridad:

28.05.2009 US 181884 P

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

12.04.2021

73 Titular/es:

**ADDBIO AB (100.0%)
Teknikringen 10
583 30 Linköping, SE**

72 Inventor/es:

**VIKINGE, ELLA CATHRINE;
ENGSTRÖM, ELIN;
ARONSSON, HENRIK y
AXELSSON, OSKAR**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 818 373 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

Películas de proteína de múltiples capas, métodos de preparación y dispositivos de suministro de fármacos e implantes biomédicos que emplean las películas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a dispositivos de suministro de fármacos que comprenden una película de proteína de múltiples capas cargada con un principio activo farmacéutico y a implantes biomédicos que comprenden un sustrato de implante y una película de proteína de múltiples capas en al menos una porción de la superficie del sustrato de implante.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Existe una necesidad continua de mejorar los implantes biomédicos y de mejorar la biocompatibilidad de los implantes biomédicos tras la implantación en un organismo, es decir, el cuerpo. Se sabe que las características de la superficie del implante se asocian fuertemente a los eventos tempranos sobre la superficie después de la implantación y estos eventos tempranos son importantes en la determinación de la compatibilidad del dispositivo. Se cree que la composición, la secuencia y otras características de las proteínas que se unen a una superficie del implante durante los primeros segundos después de la introducción en el organismo determinarán los eventos en una escala de tiempo más larga y, en última instancia, contribuirán al grado de biocompatibilidad del implante. Además, las propiedades de una superficie del implante afectan al estado de las proteínas que se asocian a la superficie, que también repercute sobre las interacciones posteriores con el organismo.

25 Típicamente, las proteínas forman una monocapa sobre una superficie en contacto con la proteína. Véase, por ejemplo, *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine, 2nd Edition*, B. Ratner y col, Editores, Elsevier Academic Press (2004), p. 245, tabla 1. Típicamente, una monocapa tiene un espesor de 2-4 nm cuando se mide con elipsometría nula. Según de Feijter y col, “*Ellipsometry as a tool to study the adsorption of synthetic and biopolymers at the air-water interface*”, *Biopolymers*, 17:1759-1801 (1978), el espesor de la monocapa se convierte en masa como $1 \text{ nm} = 0,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. En consecuencia, una monocapa de proteína sobre una superficie plana es típicamente inferior a $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y frecuentemente en el intervalo de $0,2-0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Asimismo, la elipsometría se usa frecuentemente para estudiar múltiples capas, pero no es tan precisa cuando se usa en aplicaciones de múltiples capas como demuestra Benesch et al, “*The determination of thickness and surface mass density of mesothick immunoprecipitate layers by null ellipsometry and protein ¹²⁵iodine labeling*”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 249: 84-90 (2002). Además, la elipsometría solo puede usarse sobre superficies planas y no sobre superficies con una topografía no plana, que frecuentemente es el caso de los implantes. Por estas dos razones, se usa la masa de proteína por área de superficie para caracterizar la dimensión de múltiples capas dentro de la presente descripción. De forma adicional, es importante señalar que un dispositivo con un área de superficie macroscópica de X puede tener un área de superficie microscópica, o nanosuperficie de área 10 o 100 veces X, y la masa de una monocapa sobre un dispositivo puede, por lo tanto, parecer mucho mayor que una monocapa sobre una superficie plana, debido a la topografía y la estructura.

40 Generalmente, para formar múltiples capas de una proteína sobre una superficie más gruesa que una monocapa, se usan enlazadores químicos. Por ejemplo, Tengvall et al, “*Preparation of multilayer plasma protein films on silicon by EDC/NHS coupling chemistry*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 28:261-272 (2003) describen el uso de compuestos de etil-dimetil-aminopropilcarbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) para unir monocapas de fibrinógeno, IgG, albúmina, etc., una encima de la otra para formar películas de múltiples capas. También se han usado múltiples capas de diferentes proteínas que tienen especificidad entre sí, tales como biotina y estreptavidina, o proteína y anticuerpo, para construir películas más gruesas. Se han usado películas de múltiples capas de fibrinógeno mediante el uso de EDC/NHS para el suministro de fármacos junto con implantes óseos y también para el mantenimiento de la integridad de tejidos blandos cuando se aplican a hilos de sutura. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de los EE. UU. de Aspenberg et al n.º 2006/0002970 y 2006/0003917. Skruvcoat y T-Coat de Optovent AB son ejemplos de productos comerciales que emplean dichas películas, denominadas películas FibMat. También se han usado enlazadores químicos para unir una película o recubrimiento de proteína a una superficie, es decir, una superficie de implante, así como para unir entre sí las capas secuenciales que constituyen la película de proteína. Se han usado sustancias químicas, tales como glutaraldehído (GA) y agentes de acoplamiento de silano, por ejemplo, aminopropiltrietoxi silano (APTES), para dichos fines dobles y para la unión de sustrato junto con otros enlazadores químicos usados para la formación de película de múltiples capas.

55 Sin embargo, el uso de enlazadores químicos para formar películas de proteína de múltiples capas y/o para unir películas de proteína de múltiples capas a un sustrato crea varios problemas. En primer lugar, el proceso de producción de dichas películas de múltiples capas es un procedimiento de múltiples etapas que consume mucho tiempo. A modo de ejemplo, la producción de un recubrimiento de múltiples capas de fibrinógeno usando enlazadores químicos puede llevar un promedio de 70 etapas durante un período de 2 días, necesitándose más etapas y más tiempo para capas más gruesas. Dichos procesos aumentan claramente el coste de dichas capas en términos tanto de los materiales necesarios como del tiempo de producción. En segundo lugar, el uso de enlazadores químicos introduce productos químicos adicionales en un organismo, es decir, el cuerpo, tras la implantación, aumentando los riesgos de incompatibilidad y requiriendo procedimientos reguladores de revisión y aprobación adicionales. De hecho, Sigma Aldrich, un proveedor de glutaraldehído, indica que el glutaraldehído es tóxico y peligroso para el medio ambiente,

mientras que EDC y APTES se consideran, generalmente, corrosivos. Además, puesto que los enlazadores químicos pueden potencialmente acoplarse químicamente con un fármaco cargado en la película, generando posiblemente una “nueva entidad química” desde una perspectiva reguladora, el uso de películas de múltiples capas para el suministro de fármacos puede verse limitada. El documento WO 2008/105732 A1 describe: tornillos de titanio recubiertos con bifosfonato y fibrinógeno. Antes de aplicar las múltiples capas de fibrinógeno, la superficie de titanio se funcionaliza con 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) y glutaraldehído.

También se han hecho intentos de manipular físicamente proteínas tales como fibrinógeno, lisozima y amiloide para formar fibrillas y fibras. Por ejemplo, proteínas alargadas se asocian para formar bandas que a su vez forman fibrillas, que son fibras de proteínas largas entrelazadas. Se han estudiado fibrillas para intentar comprender las interacciones de proteínas con las superficies de (bio)materiales. Véase, por ejemplo, Cacciafesta et al, “*Human plasma fibrinogen adsorption on ultraflat titanium oxide surfaces studied with atomic force microscopy*”, *Langmuir*, 16:8167-8175 (2000). Más específicamente, se han usado fibrillas de fibrinógeno para la producción de nanopartículas de Au y para la estimulación del crecimiento de la hidroxiapatita en el diseño de superficies de biomateriales. Sin embargo, los procesos para formar dichas fibrillas pueden llevar períodos prolongados de tiempo y/o necesitar condiciones rigurosas de reacción, por ejemplo, un pH bajo de alrededor de 2.

En consecuencia, se desean películas de proteína de múltiples capas mejoradas y/o métodos de preparación de dichas películas.

Resumen de la invención

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar películas de proteína de múltiples capas mejoradas y métodos de preparación de las mismas.

La invención se refiere a un implante biomédico que comprende un sustrato de implante y una película de proteína de múltiples capas sobre al menos una porción de la superficie del sustrato de implante, producido mediante un método que comprende: poner en contacto el sustrato con una solución de proteína y calentar la solución de proteína a una temperatura de 40 °C a 60 °C y al menos en un volumen correspondiente al espesor de película de proteína deseada, en donde el sustrato se forma a partir de un material que comprenden titanio, aleación de titanio, acero inoxidable, aleaciones de Co-Cr, tantalio o cerámica, en donde la solución de proteína se tampona a un pH de 4-7 y tiene una concentración de NaCl del 0,1-10 % p/v, y en donde la película de proteína de múltiples capas tiene una masa superior a 0,5 microgramos/cm², consiste esencialmente en proteína que comprende fibrinógeno, y la película se forma sin y está exenta de compuestos o materiales no terapéuticos que son extraños para el cuerpo humano y se usa para unir monocapas de proteínas a sustratos, y la película de proteína está cargada con un principio activo farmacéutico. Como se analizará con mayor detalle a continuación, la expresión “que consiste esencialmente en” en el contexto de la película de múltiples capas de la invención significa que la película se forma sin y está exenta de entidades de unión no terapéuticas, es decir, compuestos o materiales no terapéuticos que son extraños para el cuerpo humano, y se usa para unir monocapas de proteína a sustratos, y/o entre sí para formar la película de múltiples capas, y/o a un principio activo farmacéutico.

En otra realización, la invención se refiere a un dispositivo de suministro de fármacos que comprende el implante biomédico según la invención y uno o más principios activos farmacéuticos cargados en la película.

Una realización adicional de la invención se refiere a un método de fabricación del implante biomédico según la invención, que comprende poner en contacto el sustrato con una solución de proteína y calentar la solución de proteína a una temperatura de 40 °C a 60 °C y al menos en un volumen correspondiente al espesor de película de proteína deseada, en donde el sustrato se forma a partir de un material que comprenden titanio, aleación de titanio, acero inoxidable, aleaciones de Co-Cr, tantalio o cerámica, en donde la solución de proteína se tampona a un pH de 4-7 y tiene una concentración de NaCl del 0,1-10 % p/v, y en donde la película de proteína de múltiples capas tiene una masa superior a 0,5 microgramos/cm², consiste esencialmente en proteína que comprende fibrinógeno, y la película se forma sin y está exenta de compuestos o materiales no terapéuticos que son extraños para el cuerpo humano y se usa para unir monocapas de proteínas a sustratos, y la película de proteína está cargada con un principio activo farmacéutico.

Los implantes biomédicos y los métodos de la invención son ventajosos en cuanto a que proporcionan películas que están exentas de productos químicos no terapéuticos que no son deseables para aplicaciones *in vivo* tales como la implantación en el cuerpo, y/o en cuanto a que proporcionan implantes que se fabrican fácilmente y evitan uno o más procedimientos laboriosos y/o que consumen mucho tiempo de técnicas convencionales. Serán más evidentes ventajas y realizaciones adicionales de la invención en vista de la siguiente descripción detallada.

Descripción detallada

Como se analizará con mayor detalle a continuación, la expresión “que consiste esencialmente en” en el contexto de la película de múltiples capas de la invención significa que la película se forma sin y está exenta de entidades de unión no terapéuticas, es decir, compuestos o materiales no terapéuticos que son extraños para el cuerpo humano, y se usa para unir monocapas de proteína a sustratos, y/o entre sí para formar la película de múltiples capas, y/o a un principio

activo farmacéutico. Por lo tanto, la película de proteína de múltiples capas según la invención está exenta de entidades de unión, tales como los materiales enlazadores EDC/NHS, APTES y glutaraldehído empleados convencionalmente. Debe comprenderse, sin embargo, que la película de proteína de múltiples capas definida como que consiste esencialmente en proteína puede contener uno o más principios activos farmacéuticos, como se analiza en detalle a continuación. A este respecto, se apreciará que un principio activo farmacéutico se carga en la película. La frase “cargado en” dentro de la presente descripción abarca “cargado sobre”, “cargado dentro de” así como “cargado en el interior de”. El principio activo farmacéutico puede cargarse en la película mediante adsorción o absorción, en donde el agente no es parte de la estructura de película de múltiples capas, y/o un principio activo farmacéutico de este tipo puede cargarse en la película de múltiples capas mediante enlace en la película de múltiples capas. En cualquier caso, un principio activo farmacéutico de este tipo se emplea para un efecto terapéutico y no se emplea simplemente como una entidad de unión. Como tal, el principio activo farmacéutico es dispersable o puede suministrarse desde la película de múltiples capas, o actúa de manera catalítica mientras aún está en la capa múltiple.

En otra realización, se proporciona una película de proteína de múltiples capas sobre una superficie de sustrato, se carga uno o más principios activos farmacéuticos en la película de múltiples capas y se proporciona una segunda película de proteína de múltiples capas según la invención encima de la primera capa.

Un método de preparación de la película de proteína de múltiples capas sobre los implantes según la invención comprende incubar la superficie de un sustrato mediante fibrinógeno en condiciones en las que la proteína se une a la superficie y forma un agregado en un volumen que corresponde al menos al espesor deseado de la capa. En una realización, el método de preparación de la película de proteína de múltiples capas y la carga del principio activo farmacéutico en la película comprende técnicas de química en húmedo, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, procedimientos de incubación en soluciones diferentes, o técnicas de aerosol, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, pulverización en aerosol, o combinaciones de dichas técnicas.

Las películas de proteína de múltiples capas sobre los implantes según la invención tienen un espesor superior al de las películas monocapa, preferentemente superior a 5 nm medido mediante elipsometría, o una masa superior a $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. En una realización específica, las películas de proteína de múltiples capas tienen un espesor medido en masa de $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o tienen un espesor de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o más específicamente, de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. En otra realización, las películas de proteína de múltiples capas tienen un espesor de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o más específicamente, de aproximadamente $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. En otra realización, las películas de proteína de múltiples capas tienen un espesor de al menos aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. O más específicamente, al menos aproximadamente $1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o al menos aproximadamente $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

En una realización, la proteína comprende una proteína humana adicional. Se describen proteínas humanas, por ejemplo, en la base de datos de referencia de proteínas humanas (<http://www.hprd.org>). En una realización más específica, la proteína adicional comprende proteína sanguínea humana, cuyos ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, albúmina, por ejemplo, albúmina sérica, fibronectina, vitronectina, globulina, por ejemplo, inmunoglobulina (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), o una mezcla de dos o más de las mismas, proteína de tendón, por ejemplo, del tendón de Aquiles, o proteína de cartílago, por ejemplo, colágeno, o una mezcla de dos o más de dichas proteínas. En otra realización, la proteína comprende cualquier composición de las proteínas mencionadas, o más específicamente, puede usarse cualquier composición de fibrinógeno con suficiente pureza para la aplicación real. Existen productos de fibrinógeno disponibles en el mercado que pueden usarse, por ejemplo, Haemocomplettan® (CSL Behring) que contiene una cantidad total de 1925-3010 mg de polvo, que consiste en 900-1300 mg de fibrinógeno humano, 400-700 mg de albúmina sérica humana y 200-350 mg de NaCl. La proteína adicional puede purificarse a partir de tejido, o puede producirse mediante tecnología recombinante, por ejemplo, expresada en células, tales como células de mamíferos, bacterias o fago, o puede sintetizarse en una máquina. En una realización específica, la proteína adicional comprende una proteína sanguínea humana. En realizaciones adicionales, la película de proteína de múltiples capas tiene una masa de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o más específicamente, de aproximadamente $1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o tiene una masa de al menos $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, o, más específicamente, al menos $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. En otra realización, la fuente de proteína puede ser sangre humana, en particular la propia sangre del paciente. En una realización más específica, la proteína adicional comprende plasma sanguíneo humano y/o suero sanguíneo humano, que puede purificarse a partir de la propia sangre del paciente o de un paciente diferente o a partir de una combinación.

La película de proteína de múltiples capas puede emplearse como un dispositivo de suministro de fármacos en donde el fármaco que se suministra puede ser la propia proteína adicional, por ejemplo, mediante resorción de la película. En una realización específica, el fármaco es una parte integrante o parte de fusión de la proteína que forma la capa múltiple. Por ejemplo, la proteína puede ser una proteína de fusión con una porción estructural y una porción farmacéuticamente activa unida con una secuencia de aminoácidos lábil enzimáticamente. Después, el fármaco se suministra a medida que las capas de proteína se degradan *in vivo*. Alternativamente, uno o más principios activos farmacéuticos se cargan, por ejemplo, mediante adsorción o absorción o enlace, en la película de proteína de múltiples capas para el suministro *in vivo*.

Puede cargarse cualquiera de una amplia diversidad de principios activos farmacéuticos sobre la proteína de múltiples capas. En realizaciones específicas, el principio activo farmacéutico comprende un fármaco osteoactivo, por ejemplo,

- aunque no de forma limitativa, bifosfonato o ranelato de estroncio, factor de crecimiento, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, proteína morfogénica ósea (BMP), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento de tipo insulina (IGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF) o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), inhibidor de metalo proteinasa de matriz (MMP-inh), antibiótico (incluyendo compuestos antimicrobianos, incluyendo compuestos metálicos tales como compuestos que contienen o que liberan plata), o estatina, o una mezcla de dos o más de dichos agentes. En realizaciones adicionales, el principio activo farmacéutico comprende una o más tetraciclinas, tetraciclinas químicamente modificadas, inhibidores sintéticos de la metaloproteinasa de matriz, incluyendo los del subgrupo del hidroxamato, inhibidores de la ciclooxigenasa, incluyendo los inhibidores específicos de la ciclooxigenasa 2; inhibidores del factor nuclear kappa B; inhibidores de la lipooxigenasa; corticoesteroides, incluyendo glucocorticoides; antibióticos macrólidos; inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (estatinas); inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA); bloqueantes del receptor angiotensina II (BRA); aprotinina; mesilato de gabexato; sulfasalazina; inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa; e inhibidores del factor de crecimiento transformante beta.
- En una realización específica, el principio activo farmacéutico comprende un bifosfonato. Se conocen en la técnica diversos bifosfonatos y son adecuados para usar en la carga de las películas de proteína de múltiples capas de la invención incluyendo, aunque no de forma limitativa, ácido zoledrónico, ibandronato, risedronato, alendronato, etidronato, clodronato, tiludronato o pamidronato, o una mezcla de dos o más de dichos bifosfonatos.
- La película de proteína de múltiples capas se forma sobre un sustrato. Como se ha señalado, el sustrato es un implante biomédico y la película de proteína de múltiples capas se usa para mejorar la función del dispositivo de implante y/o para suministrar un fármaco al área que rodea el implante. Se usan ampliamente implantes biomédicos en, por ejemplo, ortopedia, odontología, otología, y otros entornos de hueso y tejido blando, e incluyen, aunque no de forma limitativa, implantes ortopédicos, suturas, implantes cardíacos, incluyendo catéteres, *stents* y válvulas, prótesis de vasos, dispositivos electrónicos, electrodos para estimulación cerebral profunda, etc. El implante puede estar en forma de gránulos, por ejemplo de gránulos de metal o cerámica, tales como los que se emplean en polvos de cemento óseo. En implantes ortopédicos y dentales, la película de proteína de múltiples capas puede mejorar la estabilidad temprana, el tiempo de vida/pronóstico del implante y/o la funcionalidad (tal como la carga temprana de implantes dentales o la retirada fácil de implantes, por ejemplo, en comparación con implantes recubiertos con hidroxiapatita (HA)). En implantes de tejidos blandos, la película de proteína de múltiples capas puede mantener la integridad del tejido, es decir, evitar la desintegración del tejido, en, por ejemplo, tendón, tal como el tendón de Aquiles, para cicatrizar más pronto, o en anastomosis de colon, para evitar la fuga potencialmente fatal. Además, el implante puede ser un material inerte adaptado únicamente para el suministro de fármacos *in vivo*. Por ejemplo, el implante puede comprender un material poroso para su uso como liberación lenta subcutánea de fármaco.
- La película de proteína de múltiples capas puede proporcionarse sobre toda o una porción de la superficie del sustrato, según se desee. Si se desea, la superficie del sustrato puede tratarse antes de la formación de la película de proteína sobre la misma. Por ejemplo, la superficie del sustrato puede someterse a ataque químico, ataque químico por plasma, cebado, chorro de arena, triturado o similares. La superficie resultante puede tener una superficie nanoestructurada, por ejemplo, con surcos, aristas, protuberancias, pelos, agujas o similares. La invención no se ve limitada por la topología de la superficie del sustrato. La superficie puede ser rugosa, porosa, pulida, etc. En una realización, una superficie del implante lisa puede someterse a ataque químico o a rugosificación de la superficie antes de que se aplique una película de proteína. En una realización, la superficie del sustrato se hace más biocompatible antes de la formación de la película de proteína proporcionando una película inorgánica sobre la misma, por ejemplo, una película de hidroxiapatita.
- En el proceso de producción de la película de proteína de múltiples capas y/o carga del principio activo farmacéutico, las condiciones de agregación pueden proporcionarse de diferentes maneras, en particular calentando la proteína a al menos una temperatura cuando se inicia la agregación y manteniendo la temperatura en o por encima de ese nivel durante el tiempo suficiente para que se produzca la formación de película con el espesor deseado. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la solución puede precalentarse antes de añadir el sustrato, el sustrato puede precalentarse antes de añadirlos juntos y/o el sustrato y la solución pueden mezclarse y calentarse juntos. El término solución en los ejemplos anteriores se refiere a la solución de proteína y/o a la solución de principio activo farmacéutico.
- Según otro aspecto de la invención, un método de preparación de una película de proteína de múltiples capas que tiene una masa superior a $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ comprende poner en contacto un sustrato con una solución de proteína a una temperatura que inicia un estado de la proteína similar a la agregación en la superficie del sustrato y al menos en un volumen correspondiente al espesor deseado de la película de proteína, en donde se forma una película de proteína de múltiples capas que tiene una masa superior a $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sobre el sustrato. Se emplea una solución acuosa. Esta etapa de incubación del sustrato en la solución de proteína en las condiciones especificadas da como resultado, sorprendentemente, la formación de una película de proteína de múltiples capas. Sin limitarse a la teoría, se cree que la proteína se vuelve pegajosa por las condiciones de la solución y las proteínas pegajosas se unen y/o se reticulan entre sí y con la superficie en un proceso indistinguible. Por lo tanto, será evidente que los presentes métodos proporcionan una mejora significativa de los métodos laboriosos y que consumen mucho tiempo de la técnica anterior. En una realización específica, pueden usarse procedimientos

convencionales de limpieza para producir superficies de implante limpias antes de la aplicación de la película mediante el procedimiento de incubación. El implante limpio se incuba en una solución de proteína.

5 Mediante el control de los parámetros de incubación tales como el tiempo, la temperatura, el pH, la fuerza iónica, los codisolventes y la composición de proteína, dentro de los intervalos reivindicados, se produce una película con el espesor deseado, como se demuestra en los ejemplos que se exponen en el presente documento. De forma ventajosa, en realizaciones específicas, el tiempo de incubación puede ser de hasta aproximadamente 72 horas, o de aproximadamente momentáneo a aproximadamente 72 horas, o de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 90 minutos, o de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 50 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 15 minutos. En realizaciones más específicas, estos tiempos se emplean para formar películas de proteína de múltiples capas que tienen una masa superior a aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

15 La concentración de proteína en la solución puede variar y, típicamente, concentraciones de solución más altas darán como resultado películas más gruesas. Sin embargo, la concentración no debe ser tan alta como para evitar la disolución de la proteína en la solución. En una realización, la solución de proteína comprende proteína en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, o más específicamente, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aún más específicamente, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. En otra realización, la solución de proteína comprende proteína en una cantidad de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml. La solución de proteína se tampona y los tampones adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, tampones de acetato, tampones de borato, tampones de citrato o tampones de fosfato. En una realización más específica, la solución de proteína se tampona con tampón de acetato. El pH del tampón está en un intervalo de pH 4-7, o más específicamente en un intervalo de pH 5-6. En una realización, el pH de la solución de fibrinógeno está alrededor del punto isoeléctrico (pI) de la proteína y, en una realización más específica, el pH de la solución de proteína está ligeramente por debajo o por encima del pI de la proteína, en por ejemplo, 0,1-0,5 unidades de pH. En una realización, la concentración del tampón puede estar, típicamente, en un intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM o, más específicamente, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM. La solución de fibrinógeno contiene NaCl, a una concentración del 0,1 % p/v al 10 % p/v, o más específicamente de aproximadamente el 0,5 % p/v a aproximadamente el 2 % p/v. En una realización, la solución de proteína tiene una salinidad fisiológica.

35 Preferentemente, la superficie del sustrato se limpia antes de la incubación, principalmente para retirar material orgánico. Se mencionan dos métodos para limpiar, como ejemplo ilustrativo solamente y no pretenden ser limitantes. En una realización, el sustrato puede limpiarse durante cinco minutos en etanol al 70 % en un baño ultrasónico y aclararse exhaustivamente en agua MilliQ® antes de someterse a ultrasonidos durante cinco minutos en agua. Por último, el sustrato se aclara en agua y, opcionalmente, se seca en flujo de nitrógeno. Alternativamente, el sustrato puede incubarse en un baño ultrasónico durante cinco minutos en una solución que contiene ácido acético al 2 % y triton X al 2 %. El sustrato se aclara exhaustivamente en agua y se incuba en etanol al 70 % en un baño ultrasónico, y se aclara exhaustivamente en agua y se somete a ultrasonidos durante cinco minutos en agua. Por último, el sustrato se aclara en agua y, opcionalmente, se seca en flujo de nitrógeno.

45 En una etapa de contacto (incubación) como se describe, puede formarse fácilmente una película de proteína de masa $1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ - $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, que corresponde a aproximadamente 20-25 nm cuando se mide con elipsometría. En realizaciones específicas, la película de proteína de múltiples capas tiene una masa de al menos $1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ o al menos $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. El procedimiento de contacto puede repetirse incubando el sustrato de implante (que contiene la película formada en la primera etapa) repetidamente, durante un número deseado de veces, en soluciones de proteína. En una realización, se realizan 1-10 incubaciones mientras que, en una realización más específica, se realizan 1-4 incubaciones. Opcionalmente, pueden emplearse soluciones de proteína frescas en la segunda y/o posteriores etapas de incubación. Pueden prepararse películas de múltiples capas de cualquier espesor y las películas resultantes de múltiples etapas de incubación pueden denominarse "multi-películas de múltiples capas", ya que se forman múltiples capas encima de múltiples capas. Típicamente, puede formarse fácilmente una película de múltiples capas de $3-10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (o "multi-película de múltiples capas") realizando el procedimiento como se describe de tres a cuatro veces, opcionalmente usando solución de proteína fresca en cada etapa de contacto. Puede estimarse que el espesor de esta multi-película de múltiples capas es de aproximadamente 100 nm, aunque este espesor está fuera del intervalo de medición de la elipsometría.

60 La película de proteína de múltiples capas se carga con un principio activo farmacéutico, la carga puede realizarse durante la formación de la película o en una etapa posterior. Para cargar el principio activo durante la formación de la película, el principio activo se incluye en la solución de proteína en la etapa de contacto. Si el principio activo se carga sobre la película después de la formación de la película, el sustrato, es decir, un sustrato de implante, con la película sobre el mismo, se incuba en una solución que contiene el principio activo, por ejemplo, directamente después de la formación de la película, o en cualquier momento hasta el uso del implante. Como se ha analizado en detalle anteriormente, el principio activo puede cargarse mediante adsorción o absorción, en donde el agente se incorpora no covalentemente en la película de proteína y queda retenido mediante fuerzas estéricas, hidrófobas, de enlace de hidrógeno y/o electrostáticas, o el agente puede estar unido en la película de múltiples capas.

Los parámetros adecuados para cargar la película de proteína con el principio activo farmacéutico generalmente seguirán las siguientes directrices, aunque pueden ser apropiadas algunas variaciones dependiendo de las características específicas de un sistema particular. Por ejemplo, el sustrato con película de proteína puede ponerse en contacto con una solución del principio activo a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 95 °C, y durante un período de al menos aproximadamente momentáneamente, más específicamente, de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 72 horas. En una realización más específica, el período de contacto es de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 minutos, o, más específicamente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos. La concentración del principio activo en la solución dependerá de la concentración deseada de principio activo en la película de proteína. En una realización, la solución tiene una concentración de principio activo en un intervalo de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 500 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml o, más específicamente, en un intervalo de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml. La solución de principio activo puede tamponarse, por ejemplo, en un intervalo de pH de 2-10, o más específicamente en un intervalo de pH 2-7, más específicamente un intervalo de pH de 3-5, o un intervalo de 7-10, tomando en cuenta el pI de la proteína y las cargas respectivas del principio activo y la proteína. Los tampones adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, tampones de acetato, tampones de borato, tampones de citrato o tampones de fosfato. La concentración del tampón puede estar típicamente en un intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 20 mM, o más específicamente de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM. La cantidad de principio activo cargado en la película de proteína depende del espesor de la película y de los parámetros de la etapa de contacto como se describe.

La cantidad de proteína o principio activo en la capa múltiple puede determinarse mediante diferentes métodos, por ejemplo, la elipsometría, HPLC, espectrometría de masas (por ejemplo, ICP-SFMS), marcador de isótopos o método de fluorescamina. ICP-SFMS es un método usado para cuantificar los diferentes elementos e isótopos en una muestra. Puede usarse detección de fósforo para cuantificar la cantidad de bifosfonatos absorbida en la película de proteína, puede usarse azufre para cuantificar proteína, si no está presente en los otros componentes. La fluorescamina es un fluoróforo que puede usarse para marcar proteínas para cuantificar la cantidad total de proteína en una muestra. Es un método simple que permite medir cantidades pequeñas de proteína de hasta nanogramos. Véase Sogawa y col, *Journal of Biochemistry*, 83(6):1783-1787 (1978), y Udenfriend, *Science*, 178(4063):871-872 (1972).

En una realización de la invención, puede automatizarse el método de preparación de la película de proteína, con o sin un principio activo farmacéutico. El método puede comprender un sistema de flujo con parámetros controlados, tales como, aunque no de forma limitativa, temperatura, concentración, pH, velocidad de flujo, etc., lo que hace posible producir cientos o miles de sustratos recubiertos simultáneamente.

Después de la formación de la película de proteína sobre la superficie del sustrato, con un principio activo cargado en la película, el sustrato puede aclararse, sumergirse o mantenerse tal cual, antes de secarse y envasarse. Según se desee puede emplearse una etapa de esterilización. Según una realización de la invención, para el control de calidad de las piezas recubiertas, los dispositivos de referencia se recubren en el mismo proceso y se usan para el análisis de cantidades de constituyentes.

En los siguientes ejemplos se demuestran diversas realizaciones de la invención.

Procedimientos experimentales generales: En los siguientes ejemplos, se usa agua MilliQ® para aclarar, diluir, etc., y se denomina agua. Las incubaciones se producen en un entorno de laboratorio, con un intervalo de temperatura de aproximadamente 16 °C a aproximadamente 24 °C, que reciben el nombre de temperatura ambiente. El fibrinógeno es fibrinógeno humano agotado en plasminógeno (Calbiochem, EE. UU.), el alendronato es trihidrato monosódico de alendronato (LKT Laboratories, EE. UU.), y el alendronato marcado con ¹⁴C es de Larodan Fine Chemicals, Suecia. Los discos de titanio puro son ASTM C265 de grado 2 y con un área de superficie de 0,85 cm². Las superficies de titanio son obleas de silicio con una capa de titanio de 2000 Å, preparadas mediante deposición en fase vapor, usadas en paralelo en los ejemplos en los que el espesor se mide mediante elipsometría.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de fibrinógeno (1,5 µg/cm²) cargada con el fármaco de bifosfonato alendronato (0,16 µg/cm²).

Se limpian discos de titanio puro durante cinco minutos en una solución que contiene ácido acético al 2 % y triton X al 2 %. El sustrato se aclara exhaustivamente en agua y se incuba en etanol al 70 % en un baño ultrasónico, y se aclara exhaustivamente en agua y se somete a ultrasonidos durante cinco minutos en agua. Por último, el sustrato se aclara en agua y, opcionalmente, se seca en flujo de nitrógeno.

Los discos se incuban en una solución de 2 mg/ml de fibrinógeno disuelto en tampón de acetato 10 mM y NaCl al 0,9 % p/v, a pH 5,5. La incubación se realiza en un bloque de calentamiento a 50 °C durante 10 minutos antes de que los discos se aclaren en agua y se sequen en flujo de nitrógeno. La masa de película resultante se mide como aproximadamente 1,5 µg/cm² con el método de fluorescamina y aproximadamente 25 nm con elipsometría.

Los discos de titanio con la película de múltiples capas de fibrinógeno se incuban en una solución de 0,5 mg/ml de alendronato, disuelto en tampón de acetato 2,5 mM, a pH 4. Los frascos se colocan en una mesa basculante y la incubación se realiza a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después, los discos se aclaran en agua y se secan en flujo de nitrógeno. Se detecta aproximadamente 0,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de alendronato en la película mediante el uso de alendronato marcado con ^{14}C .

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de fibrinógeno (1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) cargada con el fármaco de bifosfonato ácido zoledrónico (0,18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Los discos de titanio puro se limpian como en el ejemplo 1 y se prepara una película de fibrinógeno como en el ejemplo 1. Los discos de titanio recubiertos con fibrinógeno se incuban en una solución de 0,5 mg/ml de ácido zoledrónico (LKT Laboratories, EE. UU.), disuelto en tampón de acetato 2,5 mM a pH 4. La incubación tiene lugar con inclinación a temperatura ambiente durante 60 minutos, después de lo cual la superficie se aclara en agua y se seca en flujo de nitrógeno. Se absorbió aproximadamente 0,18 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de ácido zoledrónico, medido mediante ICP-SFMS.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con dos películas de múltiples capas de fibrinógeno (3,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) cargadas con el fármaco de bifosfonato alendronato (0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Los discos de titanio puro se limpian como se describe en el ejemplo 1 y se prepara una primera capa múltiple de fibrinógeno como en el ejemplo 1. Se repite el proceso para la formación de múltiples capas descrito en el ejemplo 1 y las superficies se aclaran y se secan como se describe. La masa total de la película de múltiples capas de fibrinógeno es de aproximadamente 3,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,

Los discos con la multi-película de múltiples capas se cargan con alendronato según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, dando como resultado aproximadamente 0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de alendronato absorbido en la película detectado mediante el uso de alendronato marcado con ^{14}C .

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de acero inoxidable con una película de fibrinógeno de múltiples capas de 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y cargada con 0,44 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de alendronato.

Se usan discos de acero inoxidable (AI) con un área de superficie de 0,85 cm^2 . Los discos se limpian como se describe en el ejemplo 1. La capa múltiple de fibrinógeno se prepara como en el ejemplo 1, dando como resultado aproximadamente 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibrinógeno con el método de fluorescamina. La mayor cantidad de fibrinógeno sobre los discos de AI en comparación con los discos de Ti se debe a una mayor rugosidad de la superficie.

Los discos de acero inoxidable recubiertos con fibrinógeno se cargan con alendronato según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, dando como resultado aproximadamente 0,44 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de alendronato detectado mediante el uso de alendronato marcado con ^{14}C .

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de fibrinógeno de múltiples capas (1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y cargada con alendronato (0,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) usando una etapa de incubación de 5 minutos.

Los discos de titanio se preparan con una película de múltiples capas de fibrinógeno según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, excepto por que los discos no se secan después del aclarado en agua. Después de eso, los discos se incuban en una solución de 0,5 mg/ml de alendronato, disuelto en tampón acetato 2,5 mM, a pH 4, a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los discos se aclaran en agua y se secan en flujo de nitrógeno. Se detecta aproximadamente 0,16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de alendronato en la película mediante el uso de alendronato marcado con ^{14}C .

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de fibrinógeno que contiene alendronato (0,12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) preparada en una incubación de fibrinógeno y alendronato combinados.

Los discos de titanio se limpian como en el ejemplo 1. Los discos se incuban en una solución de fibrinógeno y alendronato que contiene 2 mg/ml de fibrinógeno y 0,5 mg/ml de alendronato, disueltos en tampón de acetato 10 mM y NaCl al 0,9 % p/v, a pH 4. La incubación se realiza en un bloque de calentamiento a 50 °C durante 10 minutos antes de que la superficie se aclare en agua y se seque en flujo de nitrógeno. Se detecta aproximadamente 0,12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de alendronato en la película mediante el uso de alendronato marcado con ^{14}C .

Ejemplo 7 (no según la invención)

5 Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de fibrinógeno preparada a una temperatura de incubación de 55 °C.

10 Las superficies de titanio se limpian como en el ejemplo 1. Las superficies se incuban en una solución de 2 mg/ml de fibrinógeno, disuelto en tampón de acetato 10 mM y NaCl al 0,9 % p/v, a pH 5,5. La incubación se realiza en un bloque de calentamiento a 55 °C durante 10 minutos antes de que la superficie se aclare en agua y se seque en flujo de nitrógeno. El espesor de la película resultante es de aproximadamente 26 nm medido con elipsometría.

Ejemplo 8

15 Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de fibrinógeno (1,5 µg/cm²) cargada con una concentración mayor de alendronato (2,3 µg/cm²).

20 Los discos de titanio se limpian y la capa múltiple de fibrinógeno se prepara como en el ejemplo 1 excepto por que los discos no se secan después del aclarado en agua. Después de eso, los discos se incuban en una solución de 5 mg/ml de alendronato, disuelto en tampón acetato 2,5 mM a pH 4, a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los discos se aclaran en agua y se secan en flujo de nitrógeno. Se detecta aproximadamente 2,3 µg/cm² de alendronato en la película mediante el uso de alendronato marcado con ¹⁴C.

Ejemplo 9 (no según la invención)

25 Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de albúmina sérica humana (HSA) (50 nm) cargada con el fármaco de bifosfonato alendronato (0,29 µg/cm²).

30 Los discos de titanio puro se limpian como en el ejemplo 1. Los discos se incuban en una solución de 2 mg/ml de HSA (Sigma Aldrich, EE. UU.) disuelta en tampón de acetato 10 mM y NaCl al 3,0 % p/v, a pH 5,3. La incubación se realiza en un bloque de calentamiento a 70 °C durante 10 minutos antes de que los discos se aclaren en agua y se sequen en flujo de nitrógeno. El espesor de la película resultante se mide como de aproximadamente 50 nm con elipsometría.

35 Los discos de titanio con la película de múltiples capas de albúmina se incuban en una solución de 0,5 mg/ml de alendronato, disuelto en tampón de acetato 2,5 mM, a pH 4. Los discos se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos, antes de que los discos se aclaren en agua y se sequen en flujo de nitrógeno. Se detecta aproximadamente 0,29 µg/cm² de alendronato en la película mediante el uso de alendronato marcado con ¹⁴C.

Ejemplo 10 (no según la invención)

40 Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de inmunoglobulina G (IgG) (40 nm) cargada con el fármaco de bifosfonato alendronato (0,29 µg/cm²).

45 Los discos de titanio puro se limpian como en el ejemplo 1. Los discos se incuban en una solución de 2 mg/ml de IgG (Octapharma, Suiza) disuelta en tampón de acetato 10 mM y NaCl al 1,2 % p/v, a pH 4,3. La incubación se realiza en un bloque de calentamiento a 75 °C durante 10 minutos antes de que la superficie se aclare en agua y se seque en flujo de nitrógeno. El espesor de la película resultante se mide como de aproximadamente 40 nm con elipsometría. Los discos de titanio con las películas de múltiples capas de IgG se incuban en una solución de 0,5 mg/ml de alendronato disuelto en tampón de acetato 2,5 mM, a pH 4. Los discos se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos, antes de que los discos se aclaren en agua y se sequen en flujo de nitrógeno. Se detecta aproximadamente 0,29 µg/cm² de alendronato en la película mediante el uso de alendronato marcado con ¹⁴C.

Ejemplo 11

55 Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de fibrinógeno (26 nm) cargada con el antibiótico gentamicina.

60 Los discos de titanio puro se limpian como en el ejemplo 1. Los discos se incuban en una solución de 2 mg/ml de fibrinógeno disuelto en tampón de acetato 10 mM y HCl al 0,9 % p/v, a pH 5,3. La incubación se realiza en un bloque de calentamiento a 50 °C durante 10 minutos antes de que los discos se aclaren en agua y se sequen en flujo de nitrógeno. El espesor de la película resultante es de aproximadamente 26 nm medido con elipsometría.

65 Los discos de titanio con la película de múltiples capas de fibrinógeno se incuban en una solución de 10 mg/ml de gentamicina (Sigma Aldrich, EE. UU.), disuelta en agua, a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después, la actividad antibacteriana de los discos se mide con una prueba de susceptibilidad por difusión, usando placas de agar con 10⁸ unidades de formación de colonias por ml de *S. Aureus* (ATCC, EE. UU.). Los discos liberan de

aproximadamente $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de gentamicina dentro de las primeras 24 horas, y la zona de inhibición es detectable hasta 48 horas usando una prueba de transferencia de placa en serie.

Ejemplo 12

- 5 Este ejemplo demuestra la preparación de un sustrato de titanio con una película de múltiples capas de Haemocomplettan® (27 nm) cargada con el fármaco de bifosfonato alendronato ($0,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).
- 10 Los discos de titanio puro se limpian como en el ejemplo 1. Los discos se incuban en una solución de 2 mg/ml de Haemocomplettan® (CSL Behring, EE. UU.) disuelta en tampón de acetato 10 mM y NaCl al 0,9 % p/v, a pH 5,5. La incubación se realiza en un bloque de calentamiento a 50 °C durante 20 minutos antes de que los discos se aclaren en agua pero no se sequen en flujo de nitrógeno. El espesor de la película resultante se mide como de aproximadamente 27 nm con elipsometría.
- 15 Los discos de titanio con la película de múltiples capas de Haemocomplettan® se incuban en una solución de 0,5 mg/ml de alendronato, disuelto en tampón de acetato 2,5 mM, a pH 4. Los discos se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos, antes de que los discos se sumerjan en agua y se sequen en flujo de nitrógeno. Se detecta aproximadamente $0,19 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de alendronato en la película mediante el uso de alendronato marcado con ^{14}C .

REIVINDICACIONES

1. Un implante biomédico que comprende un sustrato de implante y una película de proteína de múltiples capas en al menos una porción de la superficie del sustrato de implante, producido mediante un método que comprende:
 - 5 poner en contacto el sustrato con una solución de proteína y, calentar la solución de proteína a una temperatura de 40 °C a 60 °C y al menos en un volumen que corresponde al espesor de película de proteína deseado para iniciar un proceso de agregación en la superficie del sustrato y formar una película de proteína de múltiples capas sobre el sustrato que tiene una masa superior a 0,5 µg/cm² sobre el sustrato,
 - 10 en donde el sustrato se forma a partir de un material que comprende titanio, aleación de titanio, acero inoxidable, aleaciones de Co-Cr, tantalio o cerámica, en donde la solución de proteína se tampona a un pH de 4-7 y tiene una concentración de NaCl del 0,1-10 % p/v, y
 - 15 en donde la película de proteína de múltiples capas consiste esencialmente en proteína que comprende fibrinógeno, y la película se forma sin y está exenta de compuestos o materiales no terapéuticos que son extraños para el cuerpo humano y se usa para unir monocapas de proteínas a sustratos, y la película de proteína se carga con un principio activo farmacéutico.
- 20 2. El implante biomédico de la reivindicación 1, en donde la película de proteína de múltiples capas tiene una masa de 1 µg/cm² a 50 µg/cm².
3. El implante biomédico de la reivindicación 1, en donde la película de proteína de múltiples capas tiene una masa de 1 µg/cm² a 30 µg/cm².
- 25 4. El implante biomédico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la película de proteína de múltiples capas consiste esencialmente en proteína que comprende una mezcla de fibrinógeno y albúmina.
5. El implante biomédico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el principio activo farmacéutico comprende un bifosfonato, proteína morfogénica ósea, antibiótico o estatina, o una mezcla de dos o más de dichos agentes.
- 30 6. El implante biomédico de la reivindicación 5, en donde el principio activo farmacéutico comprende un bifosfonato.
7. El implante biomédico de la reivindicación 6, en donde el bifosfonato comprende ácido zoledrónico, ibandronato, risedronato, alendronato, etidronato, clodronato, tiludronato o pamidronato, o una mezcla de dos o más de dichos bifosfonatos.
- 35 8. Un dispositivo de suministro de fármacos que comprende el implante biomédico de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6.
9. Un implante biomédico de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8 para su uso en el suministro de fármacos.
- 40 10. El dispositivo de suministro de fármacos de la reivindicación 8 o 9, en donde la película tiene una masa de 1 µg/cm² a 30 µg/cm².
11. Un método de producción de un implante biomédico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el principio activo farmacéutico se carga en la película mediante la inclusión del principio activo farmacéutico en la solución de proteína en la etapa de puesta en contacto.
- 45 12. Un método de producción de un implante biomédico de la reivindicación 11, en donde el principio activo farmacéutico se carga en la película poniendo en contacto el sustrato que tiene la película de proteína de múltiples capas formada sobre el mismo con una solución del principio activo farmacéutico a una temperatura de 0 °C a 95 °C.
- 50