



(12)

## Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der  
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2022/159751**  
in der deutschen Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2  
IntPatÜbkG)  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2022 000 720.6**  
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2022/013388**  
(86) PCT-Anmeldetag: **21.01.2022**  
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **28.07.2022**  
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung  
in deutscher Übersetzung: **16.11.2023**

(51) Int Cl.: **A61L 2/08** (2006.01)  
**A61L 2/14** (2006.01)  
**A61L 27/16** (2006.01)  
**A61F 2/02** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**63/140,513**                      **22.01.2021**      **US**

(71) Anmelder:  
**EXOGENESIS CORPORATION, Billerica, MA, US**

(74) Vertreter:  
**BOEHMERT & BOEHMERT Anwaltspartnerschaft  
mbH - Patentanwälte Rechtsanwälte, 28209  
Bremen, DE**

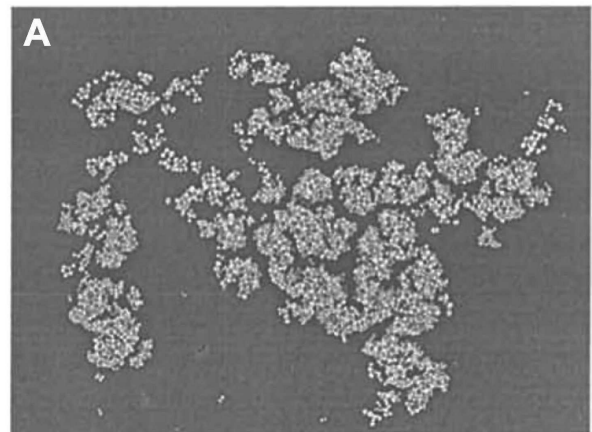
(72) Erfinder:  
**Khoury, Joseph, Billerica, MA, US; Webster,  
Thomas J., Billerica, MA, US**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.**

(54) Bezeichnung: **MIT EINEM BESCHLEUNIGTEN NEUTRALEN ATOMSTRAHL (BNAS) MODIFIZIERTES  
POLYPROPYLEN ZUR REDUZIERUNG DER BAKTERIENBESIEDLUNG OHNE ANTIBIOTIKA**

(57) Zusammenfassung: Oberflächen eines chirurgischen Implantatmaterials werden mit einem beschleunigten neutralen Atomstrahl modifiziert, Oberflächeneigenschaften des modifizierten Materials werden charakterisiert, und eine Reduzierung des breiten Spektrums der Bakterienbesiedlung auf solchen Oberflächen wird ohne Verwendung von Antibiotika erreicht.



**Beschreibung**

## QUERVERWEIS AUF VERWANDTE ANMELDUNGEN

**[0001]** Die vorliegende Anmeldung beansprucht die Priorität der vorläufigen US-Patentanmeldung Nr. 63/140,513 mit dem Titel „Accelerated Neutral Atom Beam (BNAS) Modified Polypropylene For Reducing Bacteria Colonization Without Antibiotics“, die am 22. Januar 2021 eingereicht wurde und deren Inhalt hier durch Bezugnahme in seiner Gesamtheit aufgenommen wird

## GEBIET DER TECHNOLOGIE

**[0002]** Die vorliegende Anmeldung liegt auf dem Gebiet der Technologie von Strahlen beschleunigter neutraler Atome, im folgenden als „beschleunigte neutrale Atomstrahlen (BNAS)“ bezeichnet, und bezieht sich insbesondere auf das Gebiet der Modifizierung der Oberflächeneigenschaften von orthopädischen Medizinprodukten, um die schädliche Kontamination der Oberflächen zu reduzieren.

## HINTERGRUND

**[0003]** Seit der Entdeckung von Penicillin im Jahr 1928 durch Sir Alex Flemings wurden Hunderte von neuen Antibiotika entwickelt, mit dem Ziel, bakterielle Infektionen zu bekämpfen, insbesondere solche, die mit implantierbaren Vorrichtungen verbunden sind. Der übermäßige Gebrauch und der Missbrauch von Antibiotika lösen jedoch genetische Modifikationen in Bakterien aus, was zur Entwicklung eines der beunruhigendsten Gesundheitsprobleme führt, mit denen die Gesellschaft heute konfrontiert ist: antimikrobielle Resistenz (AMR) gegen Antibiotika. Derzeit weisen die Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) darauf hin, dass es etwa 14 Bakterienstämme gibt, die als dringende oder ernste Bedrohungen eingestuft werden, was bedeutet, dass es nur wenige verfügbare Antibiotika gibt, um ihre arzneimittelresistenten Phänotypen zu behandeln. Beispielsweise entwickelte Staphylococcus aureus (SA), das üblicherweise auf der Haut gefunden wird, Resistenz gegen Beta-Lactam-Antibiotika, wie Methicillin, was zu dem Auftreten von Methicillin-resistentem Staphylococcus aureus (MRSA) führte, einem der proliferativsten Killer im Gesundheitssystem. Derzeit tragen 2 von 100 Menschen MRSA, was zu etwa 94.360 invasiven Infektionen führt, die jährlich in den USA diagnostiziert werden, mit 18.650 assoziierten Todesfällen, mehr als die Anzahl der Todesfälle durch AIDS/HIV. Daten von der CDC zeigen, dass 65% aller berichteten Staphylococcus-Infektionen in den USA durch MRSA verursacht werden, was eine Zunahme von 300% in 10 Jahren darstellt. Aber Gesundheitsprobleme beruhen nicht nur auf MRSA, da die CDC auch vorhergesagt hat, dass bis 2050 mehr Todesfälle durch alle AMR-Bakterien als durch alle Krebsarten zusammen auftreten werden, was dazu führt, dass eine Person alle 3 Sekunden an AMR stirbt. Daher besteht ein dringender Bedarf, neue Ansätze zu finden, um AMR zu besiegen, die weit von der aktuellen Verwendung von Antibiotika entfernt sind.

**[0004]** Polypropylen ist das am häufigsten verwendete Biomaterial für chirurgische Herniennetze. Ventrale Hernienreparatur ist eines der häufigsten chirurgischen Verfahren weltweit. Die Inzidenz von Infektion an der Operationsstelle (SSI), die mit Wund- oder Netzkomplicationen verbunden ist, wurde als so hoch wie 27,7% in offenen chirurgischen Verfahren und 10,5% laparoskopisch berichtet. SSI führen zu sehr hohen Kosten, die mit der Netzinfection verbunden sind, Krankenhauskosten sowie Folgekosten. Während die durchschnittlichen Kosten einer netzbasierten Hernienreparatur ohne Komplikationen in den USA ungefähr \$38.700 plus \$1.400 in den Folgekosten betragen, könnten Netzinfectionen die Gesamtgebühren auf \$82.800 in den Krankenhauskosten und \$63.400 in den Folgekosten erhöhen. Eine Verringerung bakterieller Infektionen von implantierten Netzmaterialien ist daher äußerst wichtig.

**[0005]** Es wäre wünschenswert, verbesserte Techniken zur Reduzierung bakterieller Infektionen auf implantierten Biomaterialien zu entwickeln. Aspekte der vorliegenden Offenbarung beschreiben Techniken zur Modifikation von Biomaterialoberflächen, um die Oberflächen widerstandsfähiger gegen Bakterienanhaftung zu machen. Dies verbessert die Wahrscheinlichkeit, dass Bakterien, die auf den Oberflächen vorhanden sind, durch das Immunsystem eines Subjektpatienten beseitigt werden können.

**[0006]** Die Technologie beschleunigter neutraler Atomstrahlen (BNAS) ist ein energiearmer beschleunigter Partikelstrahl, der zunehmend als Werkzeug für eine einfache Oberflächenmodifikation im Nanomaßstab von implantierbaren Medizinprodukten akzeptiert wird. Ein BNAS wird durch Beschleunigung von neutralen Argonatomen (Ar-Atomen) mit sehr geringen Energien unter Vakuum erzeugt, die eine Materialoberfläche bombardieren, wobei sie diese auf einer flachen Tiefe von 1-3 nm modifizieren. Hierbei handelt es sich um eine

nicht additive Technologie, die zu Modifikationen der Oberflächentopographie, Benetzbarkeit und Oberflächenchemie führt. Diese Modifikationen werden als wichtig bei Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen auf implantierbaren Medizinprodukten verstanden, da sie die Oberflächenenergie und anfängliche Proteinwechselwirkungen ändern, auf die Zellen angewiesen sind, um anzuhafte. Die Kontrolle der Oberflächeneigenschaften von Biomaterialien ist entscheidend für die Verbesserung der Biokompatibilität von Vorrichtungen durch Verbesserung der Gewebeintegration und Reduzierung der Bakterienanhaftung.

#### ZUSAMMENFASSUNG

**[0007]** Aspekte der vorliegenden Offenbarung verwenden die Technologie des beschleunigten neutralen Atomstrahls (BNAS), um Polypropylen zu modifizieren, um die Bakterienbesiedlung in vitro nach 24 Stunden ohne die Verwendung von Arzneimitteln oder Antibiotika zu hemmen. Wie hierin beschrieben, wurde ein BNAS entworfen und verwendet, um die Oberflächenenergie von Polypropylen so zu erhöhen, dass sie näher an der von zwei kritischen Proteinen (Mucin und Casein) liegt, die in Körperflüssigkeiten enthalten sind, die, wenn sie an einer Materialoberfläche adsorbiert sind, die Bakterienbesiedlung verringern können. Materialien, wie sie unter Verwendung von Atomkraftmikroskopie charakterisiert sind, zeigen eine erwartete größere Oberflächenrauheit und Oberfläche für die mit BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben. Eine breite Palette von gram-positiven, gramnegativen und Antibiotika-resistenten Bakterien wurde hier getestet (einschließlich Staph. epidermidis, Staph. aureus, MRSA, multiresistentes E. coli und Pseudomonas aeruginosa) und zeigte im Durchschnitt eine über 3-log-Reduktion der Bakterien nach 24 Stunden. Ferner bestätigte diese Studie eine größere Adsorption von Mucin und Casein auf BNAS-behandeltem Polypropylen als Mechanismus zur Verringerung der Bakterienbesiedlung. Schließlich verwendete diese Studie ein aggressives Reinigungsverfahren und zeigte eine starke Haltbarkeit der mit ABAN behandelten Oberflächen. Diese Studie ist wichtig, da sie einen Weg zeigt, um potenziell Polypropylen-basierte Implantatinfektionen unter Verwendung von BNAS-Modifikation ohne Verwendung von Antibiotika zu verringern.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

**[0008]** Aspekte der vorliegenden Offenbarung stellen ein Verfahren zur Reduzierung bakterieller Besiedlung auf einer Polypropylenoberfläche eines chirurgischen Netzimplantats bereit. In einer veranschaulichenden Ausführungsform beinhaltet das Verfahren die Schritte des Erzeugens eines beschleunigten neutralen Atomstrahls (BNAS) mit einem Energieniveau, das ausgewählt ist, um einer Polypropylenoberfläche eines Netzimplantats eine vorbestimmte Zunahme der Oberflächenenergie zu verleihen. Die vorbestimmte Zunahme der Oberflächenenergie wird so gewählt, dass die Oberflächenenergie der Polypropylenoberfläche so verändert wird, dass sie sich der Oberflächenenergie von Mucin- und/oder Caseinproteinen annähert, die in Körperflüssigkeiten enthalten sind und die, wenn sie an der Polypropylenoberfläche absorbiert werden, die Bakterienbesiedlung verringern.

**[0009]** In der veranschaulichenden Ausführungsform beinhaltet das Erzeugen des BNAS das Leiten von Argongas mit 200 Standardkubikzentimetern pro Minute (SCCM) durch eine Düse mit 100 mm Durchmesser, um schwach gebundene Cluster aus zwischen 100 Argonatomen und 10.000 Argonatomen zu erzeugen. Die schwach gebundenen Cluster von Argonatomen werden dann mit Elektronen beaufschlagt, um die Cluster zu einer Ladung von +1 oder +2 zu ionisieren. Die ionisierten Cluster werden dann einem ersten elektrostatischen Feld mit einer Feldstärke von 30 Kilovolt ausgesetzt, das dazu konfiguriert ist, die ionisierten Cluster zu beschleunigen. Die beschleunigten Cluster werden dann auseinandergebrochen, indem die beschleunigten Cluster mit restlichen Argonatomen im Pfad der beschleunigten Cluster kollidieren. Nach dem Auseinanderbrechen der beschleunigten Cluster werden die beschleunigten Cluster einem zweiten elektrostatischen Feld ausgesetzt, das dazu konfiguriert ist, verbleibende ionisierte Teile von Clustern aus dem BNAS-Pfad abzulenken und es neutralen Argonatomen aus den Clustern zu ermöglichen, einen vorbestimmten Impuls entlang des BNAS-Pfads beizubehalten. In der veranschaulichenden Ausführungsform wird die Oberfläche mit einer effektiven BNAS-Dosis von etwa  $2,5 \times 10^{17}$  Argonatomen pro  $\text{cm}^2$  bestrahlt, was die Oberfläche bis zu einer Tiefe von zwischen 1 Nanometer und 3 Nanometer modifiziert.

**[0010]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Offenbarung stellt ein Verfahren zur Reduzierung der Kontamination einer Polypropylenoberfläche bereit. Das Verfahren beinhaltet das Erzeugen eines beschleunigten neutralen Atomstrahls (BNAS) mit einem Energieniveau, das ausgewählt ist, um einer Polypropylenoberfläche eines mit dem BNAS zu bestrahlenden Objekts eine vorbestimmte Zunahme der Oberflächenenergie zu verleihen, und das Bestrahlen der Polypropylenoberfläche eines Objekts mit dem BNAS. Das Polypropylenobjekt kann zum Beispiel ein chirurgisches Netz wie ein Herniennetzimplantat sein.

**[0011]** Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Offenbarung wird die vorbestimmte Erhöhung der Oberflächenenergie so gewählt, dass die Oberflächenenergie von Polypropylen so verändert wird, dass sie sich der Oberflächenenergie eines oder mehrerer in Körperflüssigkeiten enthaltener Proteine annähert, die, wenn sie an der Oberfläche absorbiert werden, die Besiedlung mit Bakterien verringern. Beispiele für solche Proteine sind etwa Mucin und Casein.

**[0012]** Gemäß einer veranschaulichenden Ausführungsform kann das Verfahren das Beschleunigen von neutralen Argonatomen mit sehr geringen Energien unter Vakuum und das Bombardieren der Oberfläche mit den neutralen Argonatomen beinhalten. In der veranschaulichenden Ausführungsform modifiziert das Bombardieren die Oberfläche bis zu einer Tiefe von zwischen 1 Nanometer und 3 Nanometer.

**[0013]** Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Offenbarung beinhaltet das Verfahren zum Erzeugen des BNAS das Leiten von Argongas durch eine Düse, um schwach gebundene Cluster von Argonatomen zu erzeugen,

**[0014]** In einer veranschaulichenden Ausführungsform wird der Argongasstrom mit etwa 200 Standardkubikzentimetern pro Minute (SCCM) durch eine Düse mit einem Durchmesser von etwa 100 mm bereitgestellt. Die schwach gebundenen Cluster bestehen aus zwischen 100 Argonatomen und 10.000 Argonatomen.

**[0015]** Das Verfahren beinhaltet dann das Beaufschlagen der schwach gebundenen Cluster von Argonatomen mit Elektronen, um die Cluster zu ionisieren, und beinhaltet es ferner, die ionisierten Cluster einem ersten elektrostatischen Feld aussetzen, das dazu konfiguriert ist, die ionisierten Cluster zu beschleunigen. In der veranschaulichenden Ausführungsform ionisiert das Beaufschlagen der schwach gebundenen Cluster von Argonatomen mit Elektronen die Cluster zu einer Ladung von +1 oder +2. In einer veranschaulichenden Ausführungsform weist das erste elektrostatische Feld eine Stärke von etwa 30 Kilovolt auf.

**[0016]** In der veranschaulichenden Ausführungsform beinhaltet das Verfahren dann das Auseinanderbrechen der beschleunigten Cluster, indem die beschleunigten Cluster mit restlichen Argonatomen im Pfad der beschleunigten Cluster kollidieren. Nach dem Auseinanderbrechen der beschleunigten Cluster beinhaltet das Verfahren es, die beschleunigten Cluster einem zweiten elektrostatischen Feld auszusetzen, das dazu konfiguriert ist, verbleibende ionisierte Teile von Clustern aus dem BNAS-Pfad abzulenken und neutralen Argonatomen aus den Clustern zu ermöglichen, einen vorbestimmten Impuls entlang des BNAS-Pfads beizubehalten.

**[0017]** Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Offenbarung wird nach dem Bilden des BNAS die Oberfläche des Objekts mit einer effektiven BNAS-Dosis von etwa  $2,5 \times 10^{17}$  Argonatomen pro  $\text{cm}^2$  bestrahlt.

Beispiele:

**[0018]** Kommerzielle Polypropylenplatten (0,75 mm dick; Misumi Plastics) wurden in Scheiben mit 12 mm Durchmesser geschnitten und 30 min lang in 70 % Isopropanol gereinigt, gefolgt von 3 × 15 min langen Waschvorgängen in deionisiertem H<sub>2</sub>O. Polypropylen wurde als Kontrollprobe bereitgestellt, oder wurde durch einen BNAS unter Verwendung von Argon(Ar)-Gas auf einem beschleunigten Partikelstrahlsystem (nAccel 100, Exogenesis Corp.) behandelt, mit einem Deflektor, um geladene Cluster zu entfernen, wie zuvor ausführlich beschrieben. Kurz gesagt wurde Ar-Gas mit 200 SCCM durch eine Düse mit 100 mm Durchmesser geleitet, um schwach gebundene Cluster zu erzeugen, die aus einigen hundert bis einigen tausend Ar-Atomen bestehen. Diese Cluster werden dann durch Elektronenstoßionisation stoßionisiert, was zu einem +1- oder +2-geladenen Cluster führt, der dann durch Einführen in ein 30-kVelektrostatisches Feld beschleunigt wird. Nach dem Beschleunigen wird der Cluster dann sofort durch Orchestrieren seiner Kollisionen mit restlichen Ar-Gasatomen, die entlang des Strahlpfads in der Beschleunigungskammer vorhanden sind, auseinandergelassen. Diese Kollisionen brechen die schwachen van der Waals-Bindungen, wodurch einzelne neutrale Atome zusammen mit kleineren, geladenen Clustern freigesetzt werden. Die verbleibenden Cluster werden dann mit einem elektrostatischen Deflektor weggedrückt, der es den neutralen Atomen ermöglicht, ihren anfänglichen Impuls beizubehalten, bis sie die Materialoberfläche erreichen und mit dieser kollidieren. Die effektive Dosis des BNAS betrug  $2,5 \times 10^{17}$  Ar-Atome pro  $\text{cm}^2$ .

**[0019]** Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Studie war auch zu beurteilen, wie dauerhaft die mit BNAS behandelten Oberflächen waren, um die Bakterienbesiedlung zu minimieren. Dazu wurden einige Proben durch serielles Einweichen und Beschallen in Aceton und Ethanol für jeweils 10 Minuten gereinigt und in den Oberflächencharakterisierungs-, Bakterien- und Proteinadsorptionsexperimenten wiederverwendet

## Kontaktwinkelmessungen &amp; Oberflächenenergieberechnungen

**[0020]** Proben wurden hinsichtlich Oberflächenenergie und Bakterienfunktionen charakterisiert. Neun Replikate wurden entsprechend für jeden Probentyp ausgewählt und in 12-Well-Platten platziert. Die Well-Platten, die die Coupons enthielten, wurden anschließend in einen Reinraum überführt, der mit einem Phoenix 150 Contact Angle Analyzer ausgestattet war. Ein Drei-Lösungsmittel-System, d.h. deionisiertes Wasser, Ethylenglykol und Glycerin, wurde zur Auswertung der Oberflächenenergien der Coupons verwendet. Insbesondere wurden 16 µl pro Lösungsmittel für jede der Couponidentitäten dreifach auf die Couponoberflächen getropft, und nach 2 s wurden Bilder erhalten. Kontaktwinkel wurden mit dem DropSnake-Plugin auf Fiji gemessen. Die Oberflächenenergie jedes Substrats wurde durch Anwendung der Owens/Wendt-Theorie in Verbindung mit Kontaktwinkeldaten und Lösungsmittel-Oberflächenspannungswerten bestimmt, von denen letztere aus der Literatur erhalten wurden. Das Owens/Wendt-Modell folgt strukturell der mathematischen Formulierung, die in Gleichung 1 unten gezeigt ist, wobei  $\sigma_L^D$  und  $\sigma_L^P$  die dispersiven bzw. polaren Komponenten der Oberflächenspannung der Benetzungsflüssigkeit sind, wobei  $\sigma_S^D$  und  $\sigma_S^P$  die dispersiven bzw. polaren Komponenten der Oberflächenenergie des Substrats sind, und wobei  $\theta$  der Kontaktwinkel ist, den das Lösungsmittel mit der Substratoberfläche bildet. Ziel war es, den BNAS zu verwenden, um die Polypropylenoberfläche zu modifizieren, bis eine Oberflächenenergie nahe der Oberflächenenergie von zwei endogenen Proteinen erreicht wurde, von denen bekannt ist, dass sie die Bakterienbesiedlung reduzieren (Mucin und Casein).

$$\frac{\sigma_L (\cos\theta + 1)}{2(\sigma_L^D)^{1/2}} = \left(\sigma_S^P\right)^{1/2} \frac{\sigma_L^P^{1/2}}{\sigma_L^D^{1/2}} + \left(\sigma_S^D\right)^{1/2} \quad \text{Equation 1. Owens/Wendt Theorie}$$

## Atomkraftmikroskopie (AFM)

**[0021]** AFM-Messungen wurden unter Verwendung eines Park Systems XE-70-Instruments im kontaktlosen Modus durchgeführt. Es wurden Siliziumspitzen mit einer Resonanzfrequenz von ~330 kHz und einer Kraftkonstante von 42 N/111 verwendet (PointProbe® Plus, Nanosensoren). 1 µm<sup>2</sup> Regionen des Polypropylens wurden abgebildet und die arithmetische mittlere Rauheit (Ra) und die Zehn-Punkt-mittlere Rauheit (Rz) über diese Region gemessen.

## Bakterielle Assays

## Koloniebildende Einheiten

**[0022]** Standard-Koloniezählverfahren wurden zur Bestimmung von Bakterienfunktionen auf den Polypropylen-Coupons zur Unterstützung der Bakterienanhaftung und Proliferation implementiert. Staphylococcus epidermidis (ATCC 35984), Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA; ATCC 43300), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), multiresistentes Escherichia coli (E. coli; ATCC 25922) und Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa; ATCC 27853) wurden von der American Type Culture Collection erhalten und über Nacht in 4 ml einer 3% Tryptic Soy Broth (TSB)-Lösung kultiviert.

**[0023]** Nach einem Minimum von 16 Stunden in einem Schüttelinkubator, der bei 37 °C und 110 U/min betrieben wurde, wurden die Bakterien in TSB (in einem sterilen biologischen Sicherheitsschrank der Klasse II) auf eine Konzentration von  $1 \times 10^9$  CFU/ml verdünnt. Bakterienkonzentrationen wurden mit einem Plattenleser der Serie SpectraMax M3 gemessen, wobei ein Extinktionsausgabewert von 0,52 bei der Wellenlänge  $\lambda_a = 562$  nm einer Bakteriendichte von  $1 \times 10^9$  CFU/ml entsprach. Die mikrobiellen Suspensionen wurden weiter in TSB auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  CFU/ml verdünnt, die verwendet wurden, um die Coupons in getrennten 24-Well-Platten zu behandeln. Oberflächen wurden sterilisiert, dekontaminiert und mit 70 % Ethanol gereinigt.

**[0024]** Nachdem die Proben mit 1 ml von  $1 \times 10^6$  CPU/ml Bakterien inokuliert wurden, wurden die 24-Well-Platten über einen Zeitraum von 24 Stunden in einem stationären Inkubator mit internen Bedingungen von 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> belassen. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Platten nacheinander aus der kontrollierten Umgebung entfernt und sanft mit 1 ml steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gewaschen, um nicht befestigte und nicht anhaftende Bakterien von den Probenoberflächen zu entfernen. Die Coupons wurden vorsichtig mit sterilen Spateln aus der anfänglichen Waschlösung entfernt und in 1 ml steriler PBS eingetaucht, die in die Vertiefungen neuer 24-Well-Platten vorinjiziert wurde. Die Coupons wurden noch einmal mit 1 ml steriler PBS (3x Waschen pro Probe) gewaschen und in konischen Polypropylen-Röhrchen mit 10 ml steriler PBS verteilt. Die Röhrchen und ihr Inhalt wurden anschlie-

ßend mit einem Branson-Wasserbad-Beschallungsgerät für 15 min bewegt. Dies erleichterte das Ablösen von Bakterien von den Couponoberflächen, und die resultierenden Suspensionen wurden seriell 10 - 10<sup>6</sup>X verdünnt. 10 µl jeder Verdünnung wurden dreifach auf Trypticase-Soja-Agar(TSA)-Platten getropft und an der Luft in einem sterilen BSC-II trocken gelassen. Nach vollständiger Ablagerung der Bakterien auf dem TSA wurden die Platten gedeckelt, umgedreht (um Kondensat am Wegwaschen oder Stören der Bakterienkolonien zu hindern) und in einen stationären Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) gestellt. Die Platten wurden nach 15 Stunden aus dem Inkubator entfernt, und die Bakterienkolonien wurden manuell mit Hilfe des Cell Counter-Plugins auf ImageJ gezählt.

#### Lebend/Tot- und Kristallviolett-Assays

**[0025]** Für den Lebend/Tot-Assay wurden die Substrate am Ende des vorgeschriebenen Zeitraums für 60 Sekunden in einer Tris-gepufferten Kochsalzlösung (TBS), die aus 42 mM Tris-HCl, 8 mM Tris-Base und 0,15 M NaCl (Sigma Aldrich) bestand, gevortext. Proben wurden dann für 15 Minuten mit der BacLight Lebend/Tot-Lösung (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA), die in TBS in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration gelöst war, inkubiert. Substrate wurden zweimal mit TBS gespült und vor der Bildgebung in eine 50%ige Glycerinlösung in TBS gegeben. Substrate wurden durch Färben mit dem oben erwähnten BacLight Lebend/Tot-Färbeverfahren überprüft, um sicherzustellen, dass alle Bakterien während des Vortexens entfernt wurden. Nachdem festgestellt wurde, dass alle Bakterien von dem Substrat entfernt wurden, wurde jede Vortexlösung kombiniert und unter Verwendung des oben beschriebenen Verfahrens auf Lebend/-Tot-Bakterien getestet. Ähnliche Volumina wurden für alle Proben beibehalten, um die gleiche Verdünnung sicherzustellen. Es wurde festgestellt, dass, wenn Bakterien über die BacLight Lebend/Tot-Färbung gefärbt werden, sie anschließend immer noch durch Kristallviolett gefärbt werden können, wodurch eine dritte Art hinzugefügt wurde, auf die in der vorliegenden Studie Bakterienbesiedlung untersucht wurde. Dazu wurden Bakterien unter Verwendung eines Leica DM5500 B Fluoreszenzmikroskops mit Bildanalysesoftware für Bilder, die unter Verwendung einer Retiga 4000R-Kamera aufgenommen wurden, visualisiert und gezählt. Unter Verwendung von Standardtechniken wurden auch separate Aliquots der gevortexten Bakterienlösung erhalten und auf Kristallviolett getestet.

#### Mechanismen der Bakterienbesiedlung

##### Proteinadsorptionsexperimente

**[0026]** Proben wurden in den oben beschriebenen Bakterienkulturmedien für 24 Stunden eingeweicht. Am Ende des vorgeschriebenen Zeitraums wurden Proteine von der Oberfläche desorbiert, indem Proben für 5 Minuten in 10 % SDS eingeweicht wurden. Alle Proben wurden überprüft, um sicherzustellen, dass alle Proteine durch dieses Einweichen entfernt wurden. Der Proteinelutionsüberstand wurde dann unter Verwendung von ELISA-Assays analysiert, um zu bestimmen, welche Proteine adsorbiert wurden und wie viel adsorbiert wurde, mit einem speziellen Fokus auf Mucin, Lubricin und Casein, die alle Proteine sind, von denen bekannt ist, dass sie die Bakterienanhaftung reduzieren.

##### Korrelation von adsorbierten Proteinen mit der Hemmung der Bakterienanhaftung

**[0027]** Um schließlich die erhöhte Adsorption von Schlüsselproteinen aus den Bakterienkulturmedien mit den Proben von Interesse für die Hemmung der Bakterienbesiedlung zu korrelieren, wurden Proben zuerst mit verschiedenen Konzentrationen (von 1 Mikrogramm/ml bis 100 Mikrogramm/ml) von Proteinen beschichtet, die einen erhöhten Adsorptionstrend auf der Probe durch einfaches Einweichen für 1 Stunde zeigten. Proteine wurden von Sigma gekauft. Dann wurden die Bakterienexperimente, die im obigen Abschnitt der Bakterienexperimente erwähnt sind, an den Protein-voradsorbierten Proben durchgeführt. Da die Polypropylenproben so erzeugt wurden, dass sie eine Oberflächenenergie nahe derjenigen von Mucin und Casein aufwiesen, war zu erwarten, dass wir die verringerte Bakterienadsorption an den mit dem BNAS behandelten Proben messen würden, die mehr antibakterielle Klebproteine adsorbierten, wodurch ein Mechanismus bereitgestellt wird, weshalb die Proben die Bakterienanhaftung verringerten.

##### Statistische Analyse

**[0028]** Alle Zelleexperimente wurden dreifach durchgeführt und mindestens dreimal pro Substrattyp wiederholt. Numerische Daten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) analysiert; Werte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant betrachtet. Die Mehrbereichstests von Duncan wurden verwendet, um Unterschiede zwischen den Mittelwerten zu bestimmen.

## Kontaktwinkelmessungen &amp; Oberflächenenergieberechnungen

**[0029]** Nach dem Abschnitt der Kontaktwinkelanalysen wurden die Winkel quantifiziert, die 16  $\mu\text{l}$  Tröpfchen von deionisiertem Wasser, Ethylenglykol und Glycerin bildeten, die mit den festen Grenzflächen gebildet wurden, und die Ergebnisse sind in Tabelle 1 tabelliert und grafisch zusammengefasst. Die mit dem BNAS behandelte Probe war signifikant mehr benetzbar im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollprobe, wie im Design beabsichtigt.

Tabelle 1. Kontaktwinkelwerte (Grad) für Si-Coupons unter Verwendung des Drei-Lösungsmittel-Systems: deionisiertes Wasser ( $\text{DI-H}_2\text{O}$ ), Ethylenglykol ( $(\text{CH}_2\text{OH})_2$ ) und Glycerin ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ). Daten = Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts.  $N = 3$ .

Probe	DI H <sub>2</sub> O	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
Kontrollprobe	87,34 $\pm$ 1.44	68,44 $\pm$ 1.39	81,39 $\pm$ 1,26
mit BNAS behandelte Probe	70,83 $\pm$ 1.36	53,00 $\pm$ 7-0,89	76,70 $\pm$ 0,71

**[0030]** Die Kontaktwinkelergebnisse wurden durch Anwendung der Owens/Wendt-Theorie in linearer Form wie oben beschrieben in Oberflächenenergien für die getesteten Coupons übersetzt. Zuvor berichtete Oberflächenspannungen der Lösungsmittel bei Raumtemperatur wurden angewendet. Für deionisiertes Wasser, Ethylenglykol und Glycerin waren dies  $\sigma_{\text{H}_2\text{O}} = 72,8 \text{ mN/m}$  ( $\sigma_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{D}} = 26,4 \text{ mN/m}$ ,  $\sigma_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{P}} = 46,4 \text{ mN/m}$ ),  $\sigma_{(\text{CH}_2\text{OH})_2} = 47,7 \text{ mN/m}$  ( $\sigma_{(\text{CH}_2\text{OH})_2}^{\text{D}} = 26,4 \text{ mN/m}$ ,  $\sigma_{(\text{CH}_2\text{OH})_2}^{\text{P}} = 21,3 \text{ mN/m}$ ) und  $\sigma_{\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3} = 63,4 \text{ mN/m}$  ( $\sigma_{\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3}^{\text{D}} = 37,0 \text{ mN/m}$ ,  $\sigma_{\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3}^{\text{P}} = 26,4 \text{ mN/m}$ ). Nach Anpassung der Drei-Lösungsmittel-Ergebnisse an die Owens/Wendt-Gleichung entsprachen die Steigung und der y-Achsenabschnitt der resultierenden linearen Trendlinien den Quadratwurzeln der polaren und dispersiven Komponenten der Coupon-Oberflächenenergien, und Gesamtoberflächenenergien wurden durch Summierung von  $\sigma^{\text{D}}$  und  $\sigma^{\text{P}}$  angenähert. Diese Werte sind in Tabelle 2 gezeigt. Ergebnisse zeigten, dass die mit BNAS behandelten Proben eine signifikant größere Oberflächenenergie aufweisen, und zwar sehr nahe an der optimalen Oberflächenenergie von Mucin und Casein, von denen zuvor festgestellt wurde, dass sie die Bakterienbesiedlung maximal hemmten (40,2 mN/m).

Tabelle 2. Oberflächenenergiewerte (mN/m) für die Si-Coupons, wie durch Anwendung der Owens/Wendt-Gleichung bestimmt, in polare ( $\sigma^{\text{P}}$ ) und disperse ( $\sigma^{\text{D}}$ ) Komponenten zerlegt.

Probe	$\sigma^{\text{s}}$	$\sigma^{\text{SP}}$ (mN/m)	$\sigma^{\text{SD}}$ (mN/m)
Kontrollprobe	21,73	7,72	14,01
Mit BNAS behandelte Probe	35,58	31,56	4,02

## Analyse der Atomkraftmikroskopie

**[0031]** Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten eine signifikant verringerte Oberflächenrauheit im Nanomaßstab, gemessen durch Atomkraftmikroskopie für die mit dem BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben (**Fig. 1A-B**). Insbesondere verringerten sich die Ra-Werte von  $5,29 \text{ nm} \pm 0,348 \text{ nm}$  auf  $3,80 \text{ nm} \pm 0,14 \text{ nm}$  auf mit BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben. Ebenso verringerten sich die Rz-Werte von  $56,02 \text{ nm} \pm 2,78 \text{ nm}$  auf  $45,04 \text{ nm} \pm 5,25 \text{ nm}$  auf mit BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Coupons.

**[0032]** **Fig. 1A-B** zeigen eine AFM-Bildgebung der nanotexturierten Oberfläche auf den mit BNAS behandelten Coupons (B) im Vergleich zu den empfangenen Kontrollcoupons (A). Die Oberflächenrauheit, gemessen durch Ra, verringerte sich von  $5,29 \text{ nm} \pm 0,348 \text{ nm}$  auf der Kontrollprobe auf  $3,80 \text{ nm} \pm 0,14 \text{ nm}$  auf den mit BNAS behandelten Proben,  $p < 0,025$ ; Rz verringerte sich von  $56,02 \text{ nm} \pm 2,78 \text{ nm}$  auf der Kontrollprobe auf  $45,04 \text{ nm} \pm 5,25 \text{ nm}$  auf den behandelten Coupons,  $p = 0,135$ .

## Bakterielle Assays

**[0033]** Die Bakterienanhaftung auf den verschiedenen Polypropylen-Coupons wurde unter Verwendung der zuvor beschriebenen Plattierungstechnik ausgewertet. Beeindruckend verringerte sich die Bakterienbesiedlung auf den mit dem BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben nach 24 Stunden, unabhängig davon, ob es sich um arzneimittelresistente Bakterien oder grampositive Bakterien oder gramnegative Bakterien handelte, wie in **Fig. 2**, **Fig. 3** und **Fig. 4** für Koloniebildende Einheiten, Lebend/Tot-Assays und Kristallviolett-Färbung gezeigt. Insbesondere für die Koloniebildungsergebnisse gingen die Zählungen (in 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>) nach 24 Stunden von 3,1 auf 0,003 für Staph epi, von 5,5 auf 0,0011 für Staph aureus, von 0,8 auf 0,0003 für MRSA, von 70 auf 0,015 für arzneimittelresistentes E. coli und von 62 auf 0,019 für Pseudomonas aeruginosa auf mit BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben. Während die meisten Zellen auf beiden Proben lebend waren, gab es außerdem weniger lebende Zellen auf den BNAS-Proben als auf Kontrollproben, was die Gesamtzahl der lebenden Bakterien auf den mit dem BNAS behandelten Proben sogar noch geringer machte.

**[0034]** Solche Ergebnisse sind signifikant, da keine Arzneimittel- oder antibiotische Beschichtung in der Studie verwendet wurde und typischerweise unterschiedliche Antibiotika für grampositive im Vergleich zu gramnegativen Bakterien benötigt werden. In dieser Studie verringerte der gleiche Ansatz der Nano-Aufräumung über die BNAS-Behandlung signifikant sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien in der Nähe von Werten, die typischerweise für Antibiotika gefunden werden.

**[0035]** **Fig. 2** zeigt Koloniezählungen nach 24 h Behandlung durch Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Methicillin-resistente Staphylococcus aureus, arzneimittelresistente Escherichia coli und Pseudomonas aeruginosa. Daten = Mittelwert ± Standardabweichung: N = 3, alle mit BNAS behandelten Proben waren signifikant geringer ( $p < 0,01$ ) als Kontrollproben und die log-Reduktion ist direkt über den jeweiligen Bakterien angegeben. Zahlen geben jeweilige koloniebildende Einheiten/Quadratzentimeter auf mit BNAS behandelten Proben an.

**[0036]** **Fig. 3** zeigt Lebend/Tot-Daten nach 24 h Behandlung durch Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Methicillin-resistente Staphylococcus aureus, arzneimittelresistente Escherichia coli und Pseudomonas aeruginosa. Daten = Mittelwert ± Standardabweichung: N = 3, alle mit BNAS behandelten Proben waren signifikant geringer ( $p < 0,01$ ) als Kontrollproben.

**[0037]** **Fig. 4** zeigt Kristallviolett-Färbungsdaten nach 24 h Behandlung durch Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Methicillin-resistente Staphylococcus aureus, arzneimittelresistente Escherichia coli und Pseudomonas aeruginosa. Daten = Mittelwert ± Standardabweichung: N = 3; alle mit BNAS behandelten Proben waren signifikant geringer ( $p < 0,01$ ) als Kontrollproben.

## SEM-Analyse der Bakterienbesiedlung

**[0038]** Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigten auch die signifikant geringere S. aureus-Besiedlung auf den mit dem BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben nach 24 h Kultur (**Fig. 5A-B**).

**[0039]** **Fig. 5A-B** zeigen SEM-Bildgebung (2000X Vergrößerung) der S. aureus-Anhaftung auf (A) Kontrollcoupons und (B) mit BNAS behandelten Polypropylen-Coupons. Die Behandlung zeigt eine deutliche Reduktion der Bakterien auf der Oberfläche nach 24 h. Der Balken stellt 30 µm dar.

## Mechanismen der Bakterienbesiedlung

**[0040]** Die Ergebnisse der Proteinadsorptionsstudien zeigten signifikant höhere Werte sowohl der Mucin- als auch der Casein-Adsorption von mit BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben (0,9 µg/ml im Vergleich zu 0,1 µg/ml für Mucin bzw. 0,4 µg/ml im Vergleich zu 0,1 µg/ml für Casein). Es wurden keine Unterschiede für ein anderes Schlüsselprotein, das die Bakterienbesiedlung verringert, Lubricin, beobachtet.

**[0041]** Schließlich unterstützten die Ergebnisse eine signifikant geringere Bakterienbesiedlung nach 24 Stunden auf mit Mucin und Casein beschichteten mit BNAS behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollproben (**Fig. 6** und **Fig. 7**). Insgesamt lieferte dies den Nachweis, dass mit BNAS behandelte Proben die Adsorption von Mucin und Casein erhöhten, was wiederum die Bakterienbesiedlung hemmte. Sowohl Mucin als auch Casein weisen Oberflächenenergien um 40 mN/m auf.



**[0042]** Fig. 6 zeigt Koloniezählraten nach 24 h Behandlung durch *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*, arzneimittelresistenten *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* an Mucinvoradsorbierten mit BNAS behandelten Proben und Kontrollproben. Daten = Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung: N = 3; alle mit BNAS behandelten Proben waren signifikant geringer ( $p < 0,01$ ) als Kontrollproben.

**[0043]** Fig. 7. Koloniezählraten nach 24 h Behandlung durch *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus*, arzneimittelresistentem *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* an Caseinvoradsorbierten mit BNAS behandelten Proben und Kontrollproben. Daten = Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung: N = 3; alle mit BNAS behandelten Proben waren signifikant geringer ( $p < 0,01$ ) als Kontrollproben.

**[0044]** Schließlich, wie durch die geringen Standardabweichungen in dieser Studie beobachtet werden kann, war klar, dass das verwendete Reinigungsverfahren die Oberflächencharakterisierung, Bakterienbesiedlung und den gemessenen Wirkungsmechanismus nicht signifikant verändert haben; obwohl mehr Studien erforderlich sind, bedeutet dies eine starke Beständigkeit der mit BNAS behandelten Proben.

#### Schlussfolgerungen

**[0045]** Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass Polypropylen mit einem beschleunigten neutralen Atomstrahl (BNAS) behandelt werden kann, um eine Oberflächenenergie nahe der Oberflächenenergie von Schlüsselproteinen, die im Körper enthalten sind (Mucin und Casein), zu erzeugen, um wiederum die Bakterienbesiedlung nach 24 Stunden zu hemmen, ohne auf die Verwendung von Antibiotika zurückzugreifen. Solche Ergebnisse sind signifikant, da sie sowohl für grampositive, gramnegative als auch multiresistente Bakterien gezeigt wurden.

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- US 63/140513 [0001]

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Reduzierung bakterieller Besiedlung auf einer Polypropylenoberfläche eines chirurgischen Netzimplantats, wobei das Verfahren umfasst:

Erzeugen eines beschleunigten neutralen Atomstrahls (BNAS) mit einem Energieniveau, das so gewählt ist, dass es einer Polypropylenoberfläche eines Netzimplantats eine vorbestimmte Zunahme der Oberflächenenergie zu verleihen,

wobei die vorbestimmte Zunahme der Oberflächenenergie so gewählt ist, dass die Oberflächenenergie der Polypropylenoberfläche so verändert wird, dass sie sich der Oberflächenenergie von Mucin- und/oder Caseinproteinen annähert, die in Körperflüssigkeiten enthalten sind und die, wenn sie an der Polypropylenoberfläche absorbiert werden, die Bakterienbesiedlung verringern,

wobei das Erzeugen folgendes umfasst, Leiten von Argongas mit 200 Standardkubikzentimetern pro Minute (SCCM) durch eine Düse mit 100 mm Durchmesser, um schwach gebundene Cluster zwischen 100 Argonatomen und 10.000 Argonatomen zu erzeugen, Beaufschlagen der schwach gebundenen Cluster von Argonatomen mit Elektronen, um die Cluster zu einer Ladung von +1 oder +2 zu ionisieren,

die ionisierten Cluster einem ersten elektrostatischen Feld mit einer Feldstärke von 30 Kilovolt auszusetzen, das dazu konfiguriert ist, die ionisierten Cluster zu beschleunigen,

Auseinanderbrechen der beschleunigten Cluster, indem die beschleunigten Cluster mit restlichen Argonatomen im Pfad der beschleunigten Cluster kollidieren, und nach dem Auseinanderbrechen der beschleunigten Cluster die beschleunigten Cluster einem zweiten elektrostatischen Feld auszusetzen, das dazu konfiguriert ist, verbleibende ionisierte Abschnitte von Clustern aus dem BNAS-Pfad abzulenken und neutralen Argonatomen aus den Clustern zu ermöglichen, einen vorbestimmten Impuls entlang des BNAS-Pfads beizubehalten;

Bestrahlen der mindestens einer Oberfläche mit einer effektiven BNAS-Dosis von etwa  $2,5 \times 10^{17}$  Argonatomen pro  $\text{cm}^2$ , wobei das Bestrahlen die mindestens eine Oberfläche bis zu einer Tiefe von zwischen 1 Nanometer und 3 Nanometer modifiziert.

2. Verfahren zur Reduzierung der Kontamination einer Polypropylenoberfläche, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

Erzeugen eines beschleunigten neutralen Atomstrahls (BNAS) mit einem Energieniveau, das so gewählt ist, dass es einer Polypropylenoberfläche eines mit dem BNAS zu bestrahlenden Objekts eine vorbestimmte Zunahme der Oberflächenenergie zu verleiht;

Bestrahlen mindestens einer Polypropylenoberfläche eines Objekts mit dem BNAS.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Objekt ein chirurgisches Netz ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Objekt ein Herniennetzimplantat ist.

5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die vorbestimmte Zunahme der Oberflächenenergie so gewählt ist, dass die Oberflächenenergie von Polypropylen so verändert wird, dass sie sich der Oberflächenenergie von einem oder mehreren Proteinen annähert, die in Körperflüssigkeiten enthalten sind und die, wenn sie an der Oberfläche absorbiert werden, die Bakterienbesiedlung verringern.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das eine oder die mehreren Proteine der Gruppe angehören, die aus Mucin und Casein besteht.

7. Verfahren nach Anspruch 2, umfassend:

Beschleunigen von neutralen Argonatomen mit sehr geringen Energien unter Vakuum;

Beschießen der mindestens einer Oberfläche mit den neutralen Argonatomen, wobei das

Beschießen die mindestens eine Oberfläche bis zu einer Tiefe von zwischen 1 Nanometer und 3 Nanometer modifiziert.

8. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Erzeugen des BNAS folgendes umfasst:

Leiten von Argongas durch eine Düse, um schwach gebundene Cluster von Argonatomen zu erzeugen;

Beaufschlagen der schwach gebundenen Cluster von Argonatomen mit Elektronen, um die Cluster zu ionisieren;

die ionisierten Cluster einem ersten elektrostatischen Feld auszusetzen, das dazu konfiguriert ist, die ionisierten Cluster zu beschleunigen;

Auseinanderbrechen der beschleunigten Cluster, indem die beschleunigten Cluster mit restlichen Argonatomen im Pfad der beschleunigten Cluster kollidieren;

nach dem Auseinanderbrechen der beschleunigten Cluster, die beschleunigten Cluster einem zweiten elektrostatischen Feld auszusetzen, das dazu konfiguriert ist, verbleibende ionisierte Abschnitte von Clustern aus dem BNAS-Pfad abzulenken und neutralen Argonatomen aus den Clustern zu ermöglichen, einen vorbestimmten Impuls entlang des BNAS-Pfads beizubehalten.

9. Verfahren nach Anspruch 8, umfassend das Leiten des Argongases mit 200 Standardkubikzentimetern pro Minute (SCCM), wobei die Düse einen Durchmesser von 100 mm aufweist.

10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die schwach gebundenen Cluster aus zwischen 100 Argonatomen und 10.000 Argonatomen bestehen.

11. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Beaufschlagen der schwach gebundenen Cluster von Argonatomen mit Elektronen die Cluster zu einer Ladung von +1 oder +2 ionisiert.

12. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das erste elektrostatische Feld ein Feld von 30 Kilovolt ist.

13. Verfahren nach Anspruch 2, umfassend das Bestrahlen mindestens einer Oberfläche des Objekts mit einer effektiven BNAS-Dosis von etwa  $2,5 \times 10^{17}$  Argonatomen pro  $\text{cm}^2$ .

Es folgen 8 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

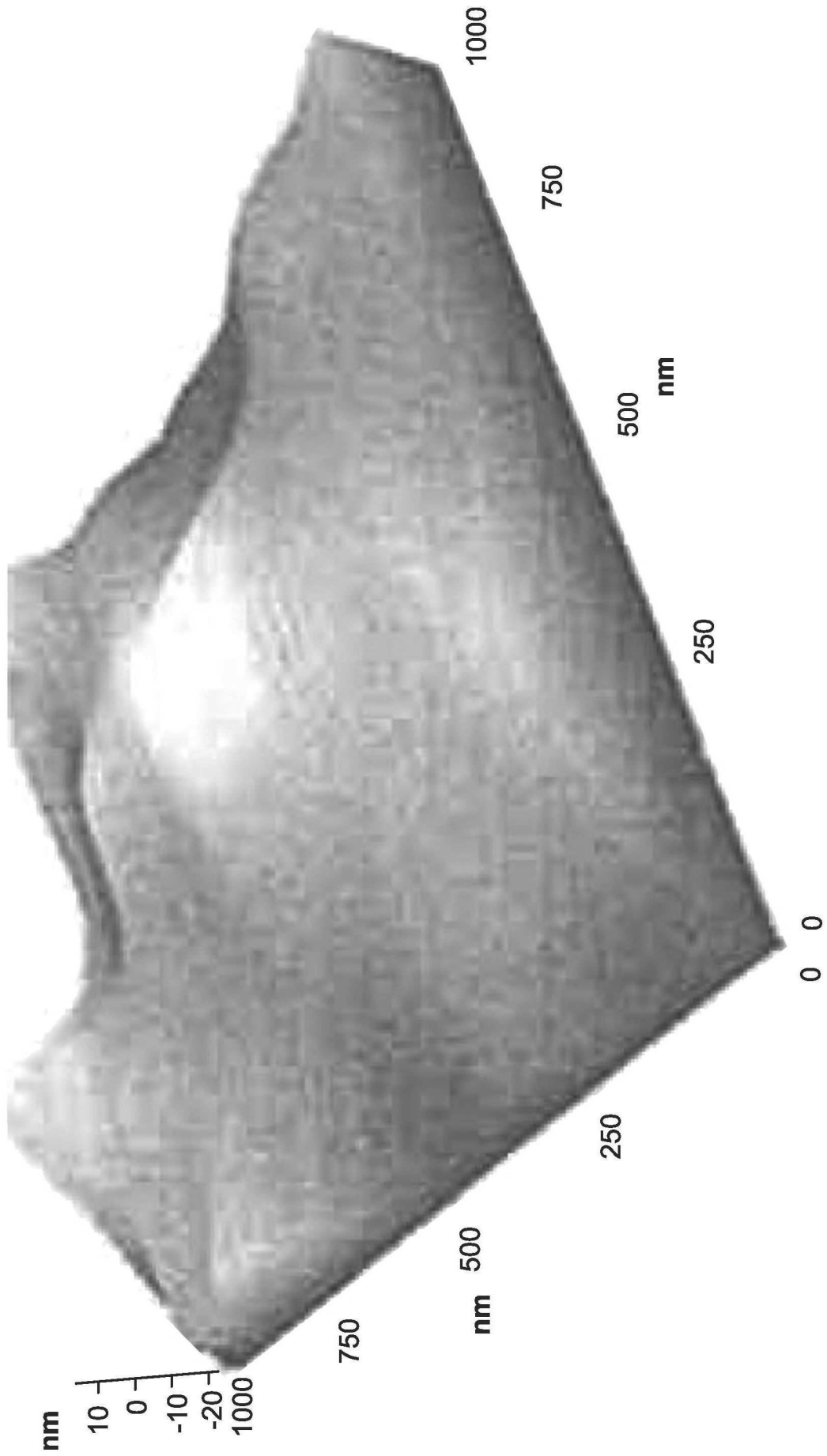


FIG. 1A

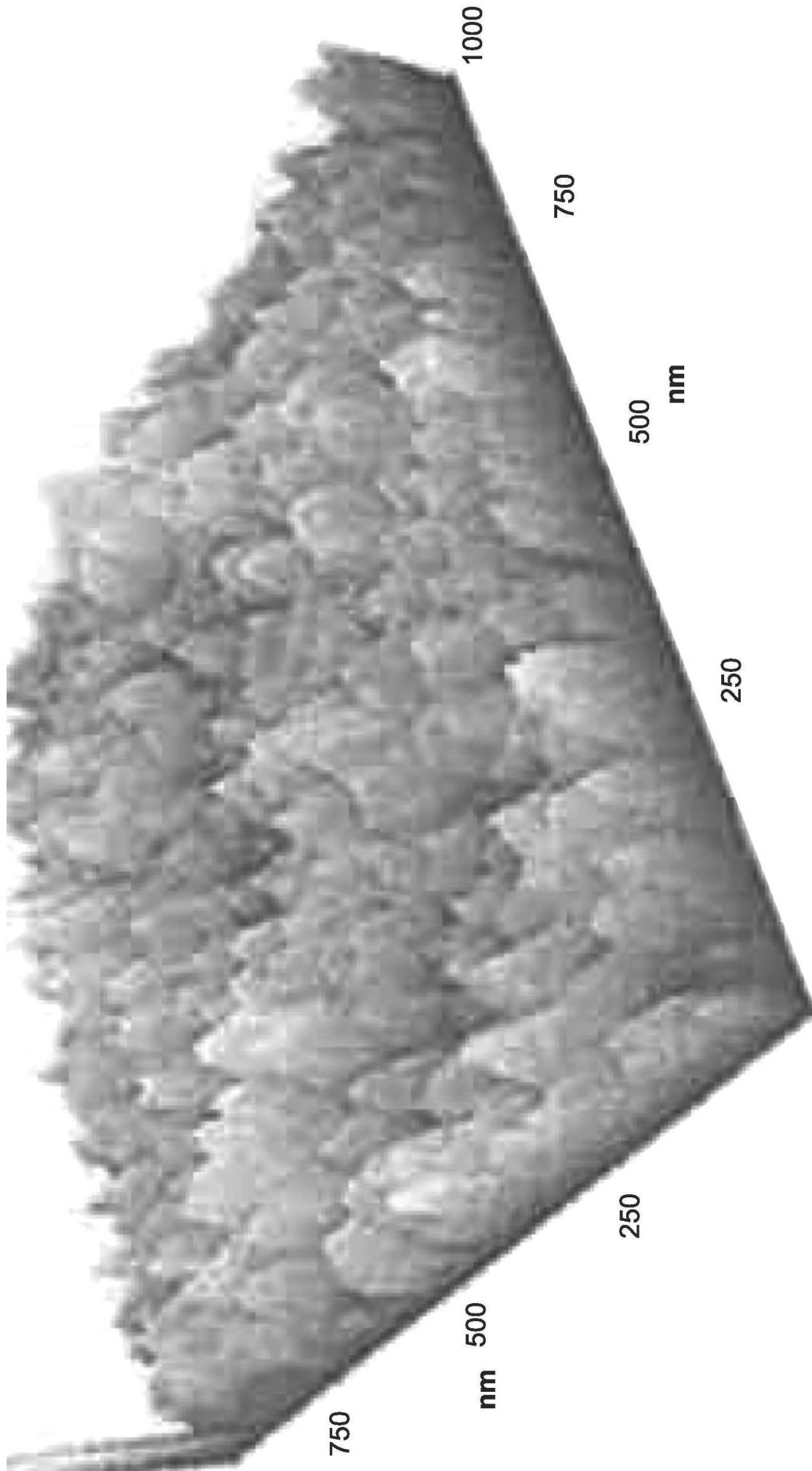
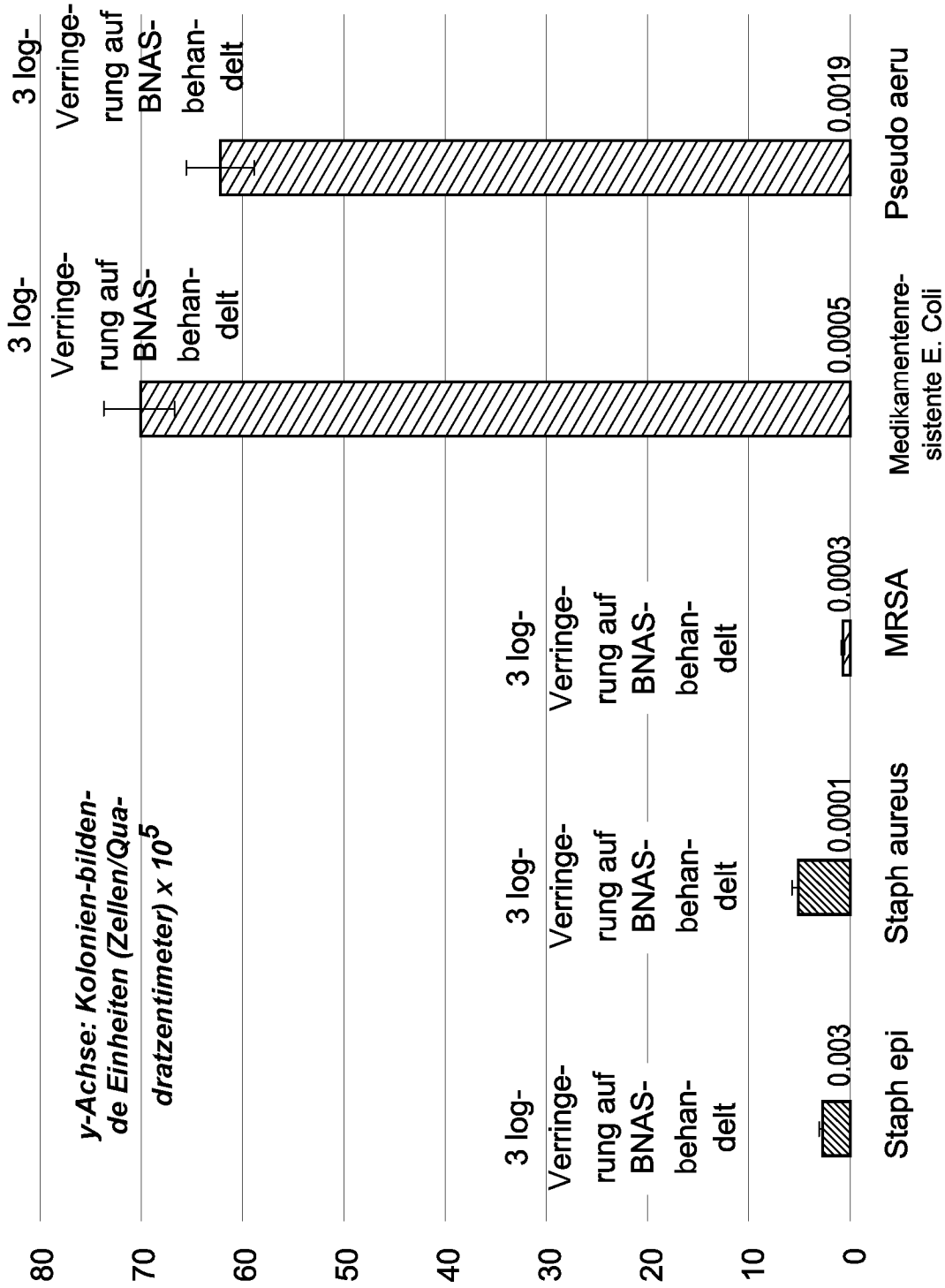
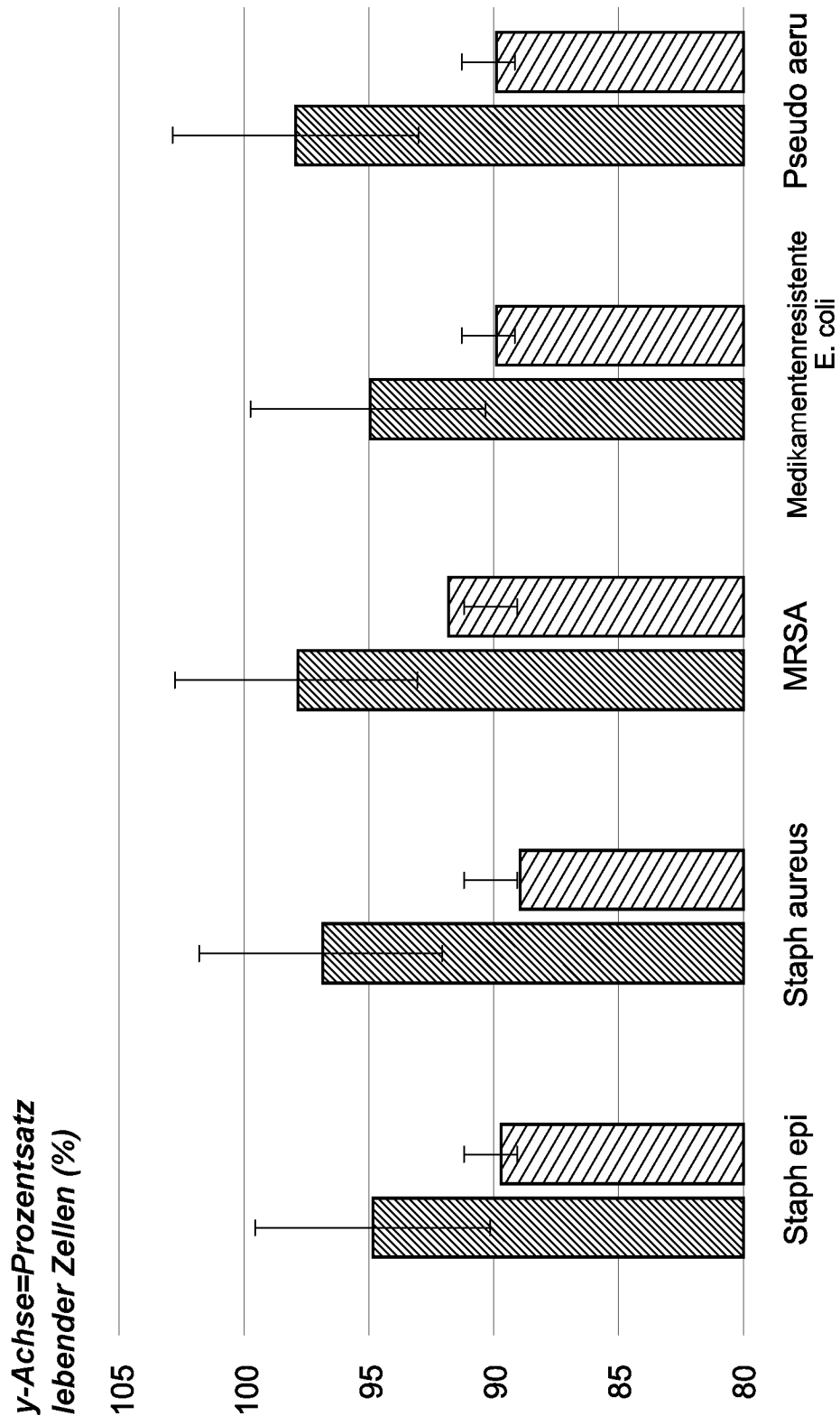


FIG. 1B



▨ Kontrolle ▩ BNAS-behandelt

**FIG. 2**



**FIG. 3**



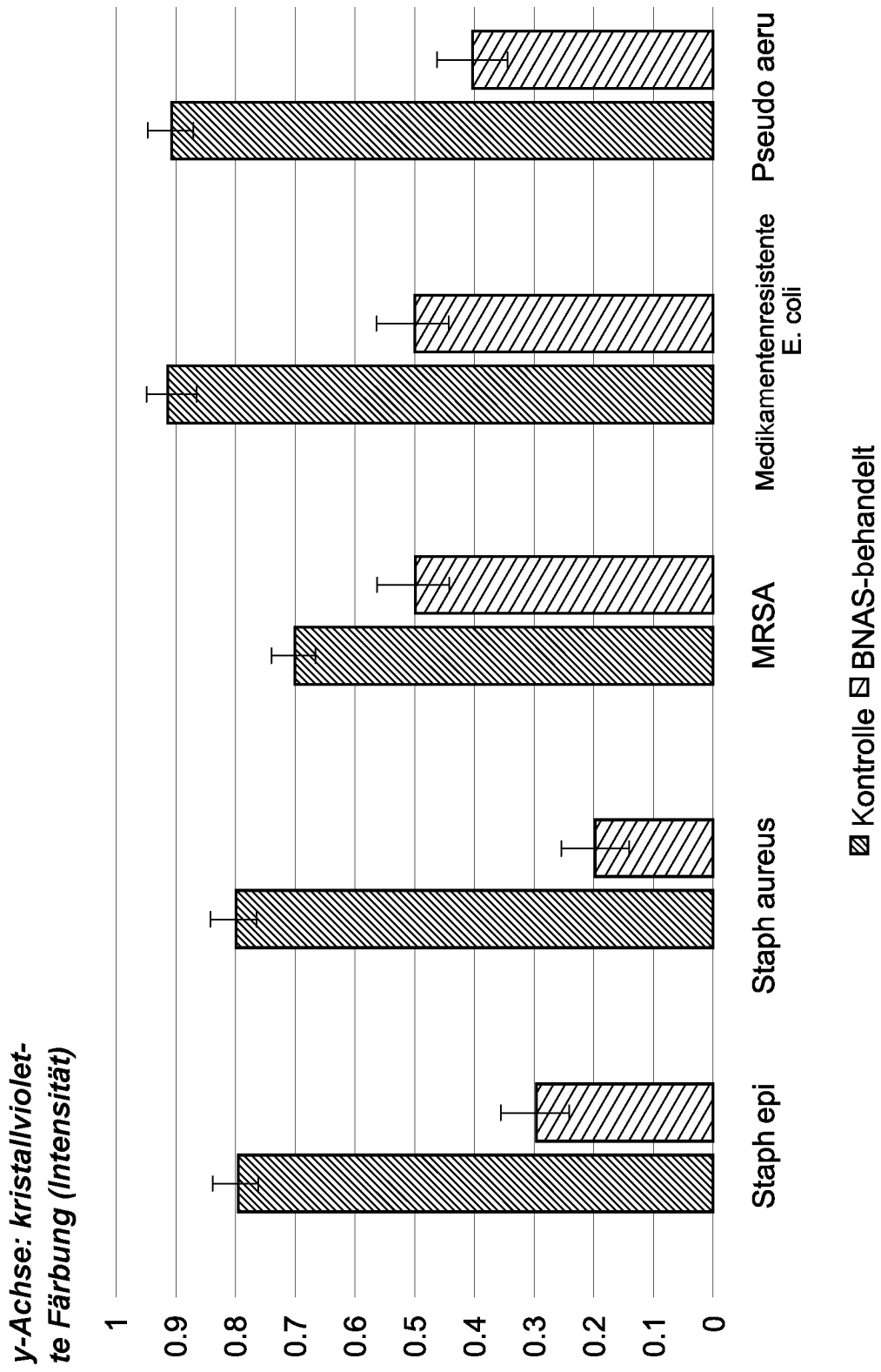


FIG. 4

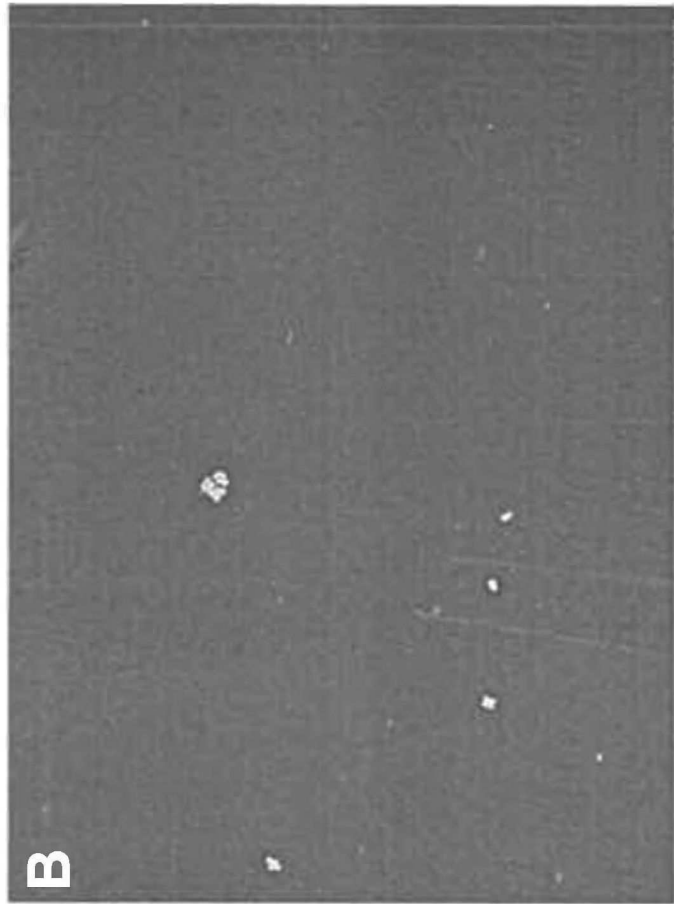


FIG. 5B

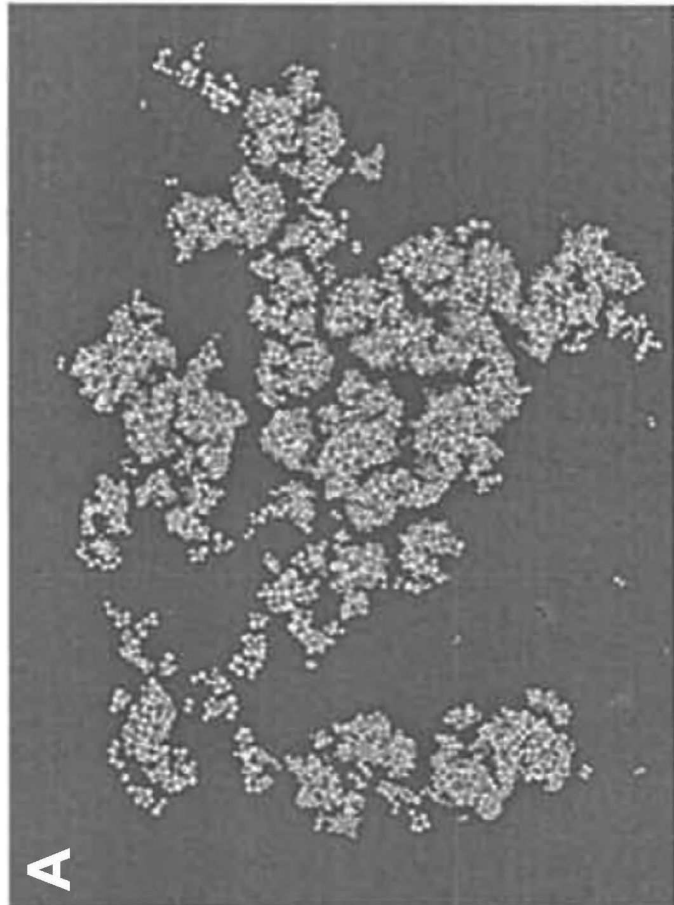
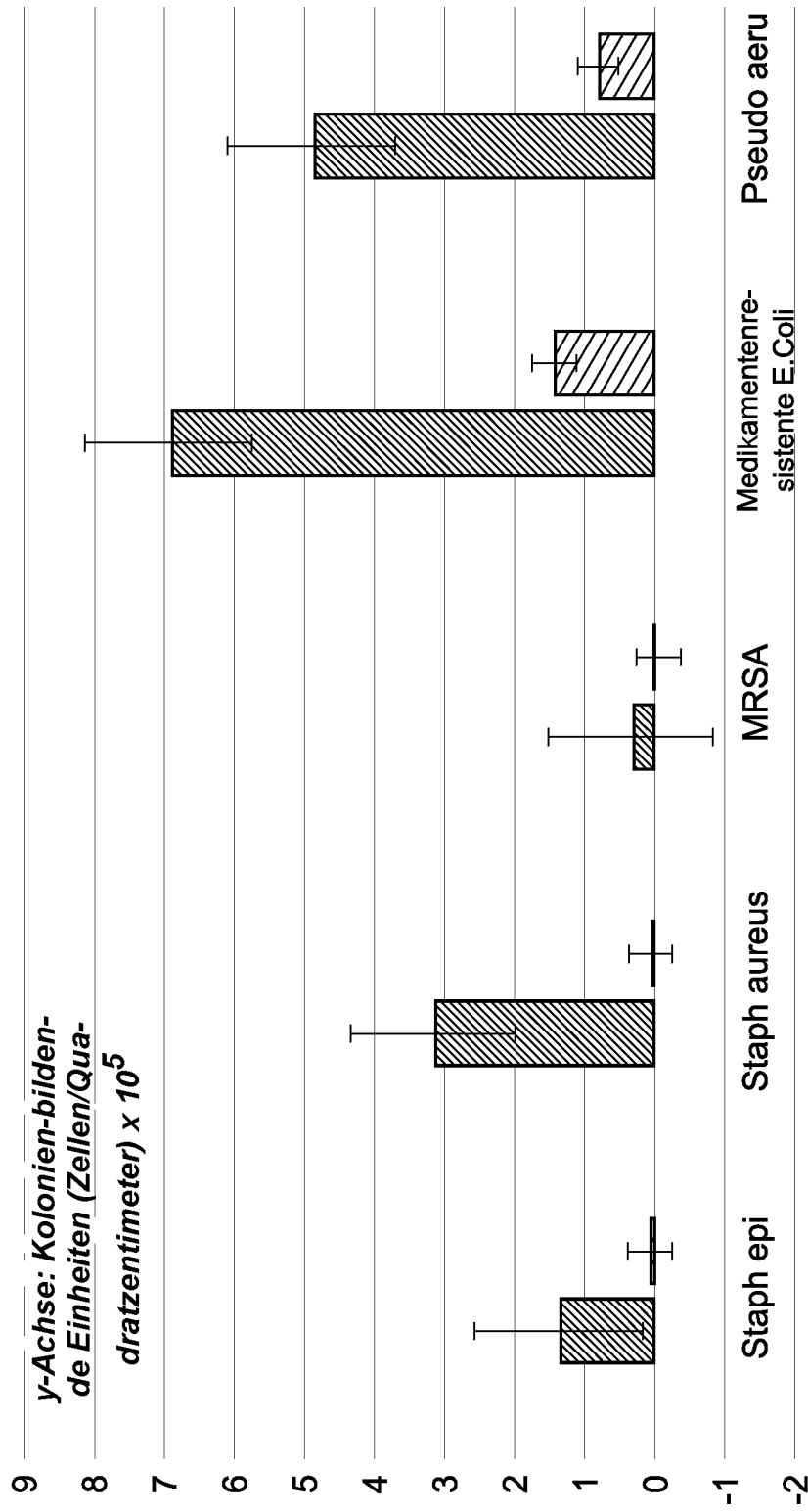
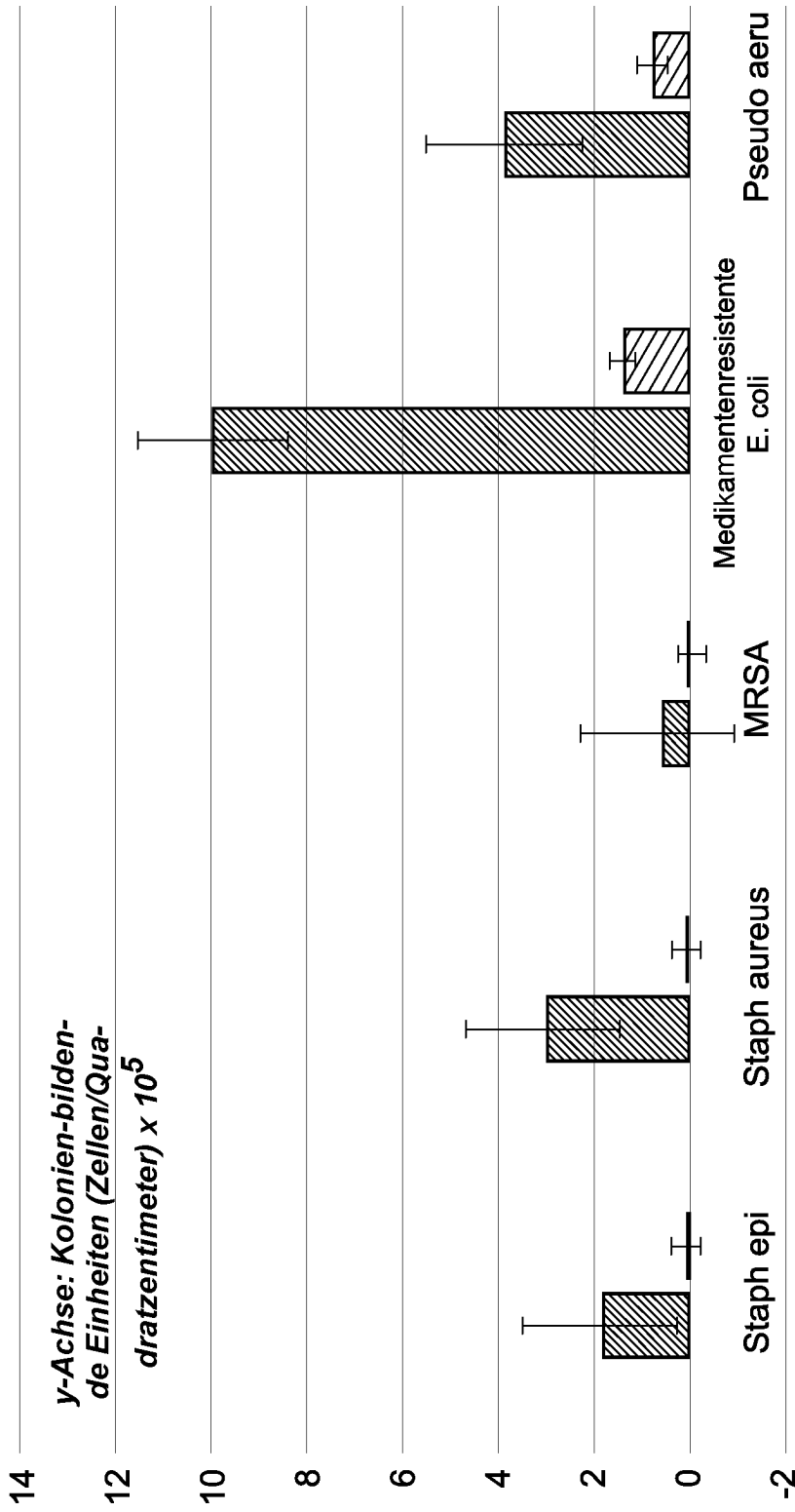


FIG. 5A



**FIG. 6**



▨ Kontrolle ▨BNAS-behandelt

**FIG. 7**