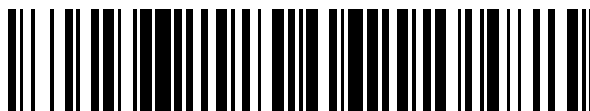


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 466**

51 Int. Cl.:

A61L 2/238	(2006.01) C23C 30/00	(2006.01)
A61L 27/30	(2006.01) A61L 33/00	(2006.01)
A61L 29/10	(2006.01) B32B 5/16	(2006.01)
A61L 31/08	(2006.01) B32B 15/02	(2006.01)
C23C 20/04	(2006.01) B32B 27/00	(2006.01)
A01N 59/16	(2006.01) C23C 18/16	(2006.01)
C23C 18/18	(2006.01) C23C 18/42	(2006.01)
C23C 18/44	(2006.01)	
A61L 27/50	(2006.01)	
C23C 26/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2007 E 07748386 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2007440**

54 Título: **Un sustrato biocompatible que tiene una superficie donadora de electrones con partículas metálicas que comprenden paladio sobre dicha superficie**

30 Prioridad:

07.04.2006 US 790307 P

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

12.03.2014

73 Titular/es:

**BACTIGUARD AB (100.0%)
P.O. BOX 5070
102 42 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:

**OHLANDER, MATTIAS y
SÖDERVALL, BILLY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 447 466 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un sustrato biocompatible que tiene una superficie donadora de electrones con partículas metálicas que comprenden paladio sobre dicha superficie

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un nuevo sustrato con nanopartículas, que permite modificar propiedades superficiales relacionadas con la biocompatibilidad de una forma repetible y controlada. Los ejemplos de propiedades superficiales que se pueden modificar incluyen, pero no se limitan a hidrofobicidad, adsorción de proteínas, crecimiento tisular, activación del complemento, respuesta inflamatoria, trombogenicidad, coeficiente de rozamiento y dureza de la superficie. La presente invención se refiere además a objetos que comprenden dicho sustrato nuevo. La presente invención se refiere además al uso de dicho sustrato. Finalmente, la presente invención se refiere además a un método para la fabricación de dicho sustrato.

Antecedentes

15 Siempre ha sido deseable modificar características superficiales para lograr propiedades útiles. En particular, se desea poder modificar propiedades superficiales que son importantes en relación con objetos biocompatibles. Se resumen más adelante ejemplos de modificaciones superficiales conocidas para diferentes propósitos.

20 El documento US 6.224.983 describe un artículo con un recubrimiento adhesivo, antimicrobiano y biocompatible, que comprende una capa de plata estabilizada por exposición a una o más sales de uno o más metales seleccionados del grupo que consiste en platino, paladio, rodio, iridio, rutenio y osmio. El grosor de la capa de plata está en el intervalo de 2-2000 Å (Ångström, Angstrom, 10^{-10} m) y otros intervalos descritos son 2-350 Å y 2-50 Å. También hay ejemplos de un grosor de la capa de plata de 50 Å, 350 Å, 500 Å y 1200 Å. El sustrato puede ser de látex, poliestireno, poliéster, poli(cloruro de vinilo), poliuretano, polímeros ABS, policarbonato, poliamida, politetrafluoroetileno, poliimida o caucho sintético.

25 El documento US 5.965.204 describe un método para preparar un artículo hecho de un sustrato no conductor que tiene un recubrimiento que comprende una capa de plata, que se ha depositado después de activar la superficie con iones estannosos. También se describe un recubrimiento que comprende además un metal del grupo del platino u oro. El grosor de la capa de plata está en el intervalo de 2-2000 Å y se describen además intervalos de 2-350 Å y 2-50 Å. También hay ejemplos de un grosor de la capa de plata de 50 Å, 350 Å, 500 Å y 1200 Å.

30 El documento 5.747.178 describe un artículo hecho depositando una capa de plata. Se dice que la capa es adhesiva, antimicrobiana y biocompatible. La capa de plata se puede estabilizar por exposición a una disolución de sal de uno o más metales del grupo del platino u oro. El grosor de la capa de plata está en el intervalo de 2-2000 Å y se describen además intervalos de 2-350 Å y 2-50 Å. También hay ejemplos de un grosor de la capa de plata de 50 Å, 350 Å, 500 Å y 1200 Å. El artículo puede estar hecho de látex, poliestireno, poliéster, poli(cloruro de vinilo), poliuretano, polímeros ABS, policarbonato, poliamida, politetrafluoroetileno, poliimida o caucho sintético.

35 El documento US 5.395.651 describe un método de preparación de un dispositivo antimicrobiano que comprende un material no conductor con un recubrimiento de plata. El recubrimiento también comprende un metal del grupo del platino y/u oro. El método comprende las etapas de: 1, activar la superficie que se va a recubrir; 2, depositar plata sobre la superficie; 3) tratar la superficie con una sal de un metal del grupo del platino y/u oro, lo cual se va a llevar a cabo solo durante el tiempo suficiente para producir un recubrimiento fino; 4, lavar con agua. El tratamiento de la etapa 3 puede usar una sal de platino o paladio en combinación con oro. No se dice nada sobre el grosor del recubrimiento del metal del grupo del platino y/u oro. El recubrimiento se describe solo como un recubrimiento fino. No se dice nada sobre partículas metálicas sobre el recubrimiento de plata. El grosor de la capa de plata está en el intervalo de 2-2000 Å y se describen además intervalos de 2-350 Å y 2-50 Å. También hay ejemplos de un grosor de la capa de plata de 50 Å, 350 Å, 500 Å y 1200 Å.

45 El documento US 5.320.908 describe un recubrimiento adhesivo, antimicrobiano y biocompatible que consiste esencialmente en una capa de plata cubierta por uno o más metales del grupo del platino u oro. El recubrimiento puede ser transparente para el ojo humano. El grosor de la capa de plata está en el intervalo de 2-2000 Å y se describen además intervalos de 2-350 Å y 2-50 Å. También hay ejemplos de un grosor de la capa de plata de 50 Å, 350 Å, 500 Å y 1200 Å. El artículo puede estar hecho de látex, poliestireno, poliéster, poli(cloruro de vinilo), poliuretano, polímeros ABS, policarbonato, poliamida, politetrafluoroetileno, poliimida o caucho sintético.

50 El documento US 5.695.857 describe superficies antimicrobianas con varias capas de un primer metal y un segundo metal más noble. El metal activo antimicrobiano puede ser por ejemplo platino, oro, plata, cinc, estaño, antimonio y bismuto. El metal más noble se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en platino, osmio, iridio, paladio, oro, plata y carbono. La superficie es para usar con fluidos biológicos y cada una de las capas que no está en contacto con el sustrato es discontinua de modo que la capa de debajo está expuesta. Un ejemplo de una superficie es plata recubierta con oro o platino. Otros ejemplos son cobre en combinación con plata, cobre en combinación con una aleación de cobre y plata, cobre en combinación con oro o una aleación de plata y cobre en combinación con oro.

5 El documento CH 654738 A5 describe implantes quirúrgicos hechos de acero inoxidable, que están recubiertos de una primera capa de cobre y una segunda capa de plata, oro, rodio o paladio. Se describe que la plata tiene una acción bactericida. El documento CH 654738 A5 describe explícitamente una superficie donde el acero inoxidable está recubierto con 10 μm de cobre y 5 μm (50.000 Å) de paladio. Todas las superficies descritas en el documento CH 654738 A5 tienen una capa de 10 μm de cobre (100.000 Å) y 10 μm de plata o 5 μm de oro o 5 μm de paladio.

10 El documento WO 2005/073289 describe fibras hechas de un material compuesto polimérico que comprende nanopartículas metálicas. Se expone que muchos metales tienen efectos antimicrobianos. Se mencionan fibras antimicrobianas. Un ejemplo es una fibra hidrófila usada en vendajes antimicrobianos para heridas. Las fibras con propiedades antimicrobianas pueden comprender Ag, Au, Pt, Pd, Ir, Sn, Cu, Sb, Bi o Zn o cualquier combinación de los mismos.

15 En el documento US 6.168.633 B1, el implante está compuesto de un cuerpo central que tiene una superficie exterior de una composición de al menos dos componentes metálicos biocompatibles diferentes o componentes de aleación metálica en contacto íntimo entre sí, teniendo cada uno de dichos metales distintos o componentes de aleación metálica un EMF suficiente para formar una diferencia de potencial de al menos 25 mV y preferiblemente alrededor de 100 mV.

Breve resumen de la presente invención

20 Un problema en el estado de la técnica en relación con las superficies es cómo proporcionar una superficie que sea biocompatible, en donde se pueda modificar de una forma repetible la hidrofobicidad, adsorción de proteínas, crecimiento tisular, activación del complemento, respuesta inflamatoria, trombogenicidad, coeficiente de rozamiento y dureza de la superficie.

25 Los autores de la presente invención han descubierto que el problema mencionado antes en el estado de la técnica se resuelve mediante un sustrato que tiene una superficie donadora de electrones, según la reivindicación 1, caracterizado porque hay partículas metálicas sobre dicha superficie, dichas partículas metálicas comprenden paladio y al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en oro, rutenio, rodio, osmio, iridio y platino, y en donde la cantidad de dichas partículas metálicas es de 0,001 a aproximadamente 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Se definen otras realizaciones de la presente invención en las reivindicaciones dependientes adjuntas, que se incorporan en la presente memoria por referencia.

Descripción

Definiciones

30 Antes de mostrar y describir la invención con detalle, debe entenderse que esta invención no está limitada a configuraciones, etapas de procedimiento y materiales particulares descritos en la presente memoria ya que dichas configuraciones, etapas de procedimiento y materiales pueden variar algo. También hay que entender que la terminología usada en la presente memoria se usa solo con el propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante, puesto que el alcance de la presente invención está limitado solo por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

35 Debe indicarse que, como se usa en esta memoria descriptiva, y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Los siguientes términos se usan a lo largo de toda la descripción y reivindicaciones.

40 “Biocompatible” como se usa en la presente memoria es la capacidad de un material para comportarse con una respuesta adecuada del hospedante en una aplicación específica.

“Biopelícula” como se usa en la presente memoria es una capa fina en la que están insertados microorganismos. Las biopelículas se producen cuando microorganismos colonizan una superficie.

45 “Activación del complemento” como se usa en la presente memoria es un sistema complejo de factores en el plasma sanguíneo que pueden ser activados por una reacción en cadena desde el componente C1 al C9, lo que da lugar a una serie de efectos biológicos. La activación del complemento se produce de dos formas a) la clásica C1 a C9, o b) la alternativa por activación directa de C3.

“Ángulo de contacto”. Para una gota dada sobre una superficie sólida, el ángulo de contacto es una medición del ángulo formado entre la superficie de un sólido y la línea tangente al radio de la gota desde el punto de contacto con el sólido.

50 “Material donador de electrones” como se usa en la presente memoria, es un material que en relación con otro material más noble tiene la capacidad de transferir electrones al material más noble. Un ejemplo es un metal menos noble junto con un metal más noble.

“Superficie donadora de electrones” como se usa en la presente memoria es una capa superficial que comprende un

material donador de electrones.

5 “Hidrofobicidad” de una superficie, como se usa en la presente memoria, describe las interacciones entre la superficie y agua. Las superficies hidrófobas tienen poca o no tienen tendencia a absorber agua y el agua tiende a “formar perlas” sobre sus superficies. El término hidrofobicidad de una superficie también está estrechamente conectado con su energía superficial. Mientras que la energía superficial describe interacciones de la superficie con todas las moléculas, la hidrofobicidad describe las interacciones de la superficie con el agua.

10 “Histéresis del ángulo de contacto” como se usa en la presente memoria, es la diferencia entre los valores del ángulo de contacto de avance y de retroceso. El ángulo de contacto de avance de una gota de agua sobre una superficie es el ángulo de contacto cuando el límite entre el agua y el aire se mueve hacia delante y moja la superficie, mientras que el ángulo de retroceso es el ángulo de contacto cuando el límite entre el agua y el aire retrocede sobre una superficie previamente mojada.

15 La “respuesta inflamatoria” se produce cuando los tejidos son dañados por virus, bacterias, traumatismo, productos químicos, calor, frío o cualquier otro estímulo dañino. Los productos químicos incluyendo bradiquinina, histamina, serotonina y otros, son liberados por células especializadas. Estos productos químicos atraen macrófagos tisulares y glóbulos blancos para ubicarse en una zona para absorber y destruir sustancias extrañas.

“Modificar” significa reducir o potenciar una propiedad.

20 “Noble” se usa en la presente memoria en un sentido relativo. Se usa para referirse a materiales que incluyen metales que dependen cada uno de cómo interactúan entre sí. Cuando dos metales se sumergen en un electrolito, mientras están eléctricamente conectados, la expresión metal “menos noble” se usa para indicar el metal que experimenta corrosión galvánica. La expresión “más noble” se usa para indicar el otro metal. Los electrones se transferirán del metal “menos noble” al metal más noble.

“Adsorción de proteínas” como se usa en la presente memoria es el fenómeno donde proteínas se adhieren a una superficie debido a fuerzas atractoras generales entre las proteínas y la superficie.

“Sustrato” como se usa en la presente memoria es la base, que se trata según la presente invención.

25 “Crecimiento tisular” es el proceso donde las células empiezan a crecer sobre una superficie, formando tejido nuevo.

“Trombogenicidad” como se usa en la presente memoria es la capacidad de un sustrato para inducir coagulación de sangre.

Descripción detallada de la presente invención

30 De acuerdo con la presente invención, se trata un sustrato para darle propiedades deseadas. El sustrato puede estar hecho de una amplia variedad de materiales. En una realización, el sustrato está hecho de un material que tiene una superficie donadora de electrones. En una realización alternativa, está hecho de un material que no tiene una superficie donadora de electrones. En el caso de una superficie donadora de electrones, las partículas metálicas se pueden aplicar directamente sobre la superficie donadora de electrones. En el caso donde la superficie no es donadora de electrones, se debe aplicar una capa de un material donador de electrones para crear una superficie donadora de electrones.

35 La presente invención comprende un sustrato que tiene una superficie donadora de electrones, caracterizada porque hay partículas metálicas sobre dicha superficie, dichas partículas metálicas comprenden paladio y al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en oro, rutenio, rodio, osmio, iridio y platino, y en donde la cantidad de dichas partículas metálicas es de 0,001 a 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Una cantidad preferida de dichas partículas metálicas es de 0,01 a 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Una cantidad particularmente preferida de dichas partículas metálicas es de 0,01 a 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

O bien el propio sustrato es donador de electrones o se aplica una capa de un material donador de electrones sobre el sustrato. En el caso donde se aplica el material donador de electrones sobre el sustrato, se aplica en una cantidad de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

45 Un material donador de electrones no tiene necesariamente una superficie donadora de electrones. Un ejemplo es el aluminio, que al aire forma una capa de óxido, que no es una superficie donadora de electrones.

El material donador de electrones es cualquier material con la capacidad para formar una superficie donadora de electrones, tal como un polímero conductor o un metal. En el caso de un metal, debe ser menos noble que cualquiera de los metales del grupo que consiste en paladio, oro, rutenio, rodio, osmio, iridio y platino.

50 El metal para usar como una superficie donadora de electrones es un metal seleccionado del grupo que consiste en plata, cobre y cinc.

En una realización de la presente invención, el sustrato es un sustrato polimérico.

En una realización, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en látex, vinilo, polímeros que comprenden grupos vinilo, poliuretano-urea, silicona, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, estireno, poliuretano, poliéster, copolimerizados de etileno y acetato de vinilo, poliestireno, policarbonato, polietileno, poliacrilato, polimetacrilato, acrilonitrilo-butadieno-estireno, poliamida y poliimida, o mezclas de los mismos.

- 5 En otra realización de la presente invención, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en un polímero natural, un polímero degradable, un polímero comestible, un polímero biodegradable, un polímero que no daña el medio ambiente, y un polímero de calidad médica.

En otra realización de la presente invención el sustrato es un metal.

- 10 Un metal preferido para el sustrato se selecciona del grupo que consiste en acero inoxidable, acero de calidad médica, titanio, titanio de calidad médica, cromo y aluminio, o mezclas de los mismos.

En otra realización de la presente invención el sustrato se selecciona del grupo que consiste en vidrio, minerales, zeolitas, piedra y cerámicas.

- 15 En otra realización de la presente invención, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en papel, madera, fibras tejidas, fibras, fibras de celulosa, cuero, carbono, fibras de carbono, grafito, politetrafluoroetileno y poliparafenilentereftalamida.

En otra realización de la presente invención, el sustrato tiene la forma de una partícula.

En una realización de la presente invención se proporciona un objeto que comprende un sustrato según la presente invención. Los ejemplos de un objeto que comprende un sustrato según la presente invención son dispositivos médicos, instrumentos médicos, artículos desechables, artículos médicos desechables.

- 20 Las partículas deben comprender siempre paladio. Además del paladio, hay al menos otro metal. Se puede usar una relación de paladio a otros metales en las partículas metálicas de 0,01:99,99 a 99,99:0,01, en la presente invención. Se prefiere una relación de 0,5:99,5 a 99,8:0,2. Las relaciones particularmente preferidas son de 2:98 a 95:5. Las relaciones muy particularmente preferidas son de 5:95 a 95:5. En otra realización, las relaciones son de 10:90 a 90:10.

- 25 En una realización de la presente invención dichas partículas metálicas, además de paladio, comprenden oro.

Los autores de la presente invención han descubierto que se logran propiedades ventajosas cuando dichas partículas metálicas tienen un tamaño medio de 10 a 10000 Å.

En una realización, los tamaños medios para dichas partículas metálicas son de 100 a 600 Å.

- 30 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un objeto que comprende cualquiera de los sustratos descritos en la presente memoria.

También se proporciona un dispositivo médico que comprende cualquiera de los sustratos descritos en la presente memoria.

También se proporciona un artículo desechable que comprende cualquiera de los sustratos descritos en la presente memoria.

- 35 La presente invención también proporciona un artículo dental, así como equipamiento dental, implantes dentales y dispositivos dentales, que comprenden cualquiera de los sustratos descritos en la presente memoria.

La cantidad aplicada de las partículas metálicas se expresa en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y hay que comprender que las partículas metálicas no forman una capa que cubre, sino que en su lugar son partículas o agregados uniformemente distribuidos sobre dicha superficie donadora de electrones.

- 40 Se aplica preferiblemente una capa aplicada de un material donador de electrones de modo que sea uniforme, esencialmente sin aglomerados o agregados sobre la superficie. Si la capa de superficie donadora de electrones es homogénea y uniforme, la cantidad aplicada en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ se puede convertir en un grosor en Å. Una cantidad aplicada de 0,05- 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ corresponde a 4,8-380 Å, 0,5-8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ corresponde a 48-760 Å, y 0,8-12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ corresponde a 76-1140 Å.

- 45 En una realización de la presente invención, la superficie donadora de electrones es una capa de plata esencialmente pura disponible en el comercio, que no excluye la posibilidad de pequeñas cantidades de impurezas.

- 50 Si el sustrato no tiene una superficie donadora de electrones y por lo tanto es necesaria la deposición de una superficie donadora de electrones, la deposición se lleva a cabo usando un método seleccionado del grupo que consiste en deposición química de vapor, pulverización catódica y deposición de metal a partir de una disolución que comprende una sal de metal. El resultado de la deposición es una capa uniforme esencialmente sin agregados o

aglomerados. Preferiblemente, la deposición se lleva a cabo de modo que la primera capa tiene una buena adhesión con el sustrato.

Ahora se describe una realización de la presente invención para preparar el sustrato recubierto. Para sustratos que no tienen una superficie donadora de electrones, el método incluye algunas o todas las etapas:

- 5 1. pretratamiento
2. lavado
3. activación
4. deposición de una superficie donadora de electrones
5. lavado

- 10 6. deposición de partículas metálicas
7. lavado
8. secado

Para objetos con una superficie donadora de electrones, el método comprende las etapas de

1. lavado
- 15 2. deposición de partículas metálicas
3. lavado
4. secado

A continuación se describe con más detalle una realización de las etapas 1 a 9 para sustratos que no tienen superficie donadora de electrones.

- 20 El pretratamiento se puede hacer en una disolución acuosa de una sal estannosa que contiene de 0,0005 a 30 g/l de iones estannosos. El pH es de 1 a 4 y se ajusta con ácido clorhídrico y/o sulfúrico. El tiempo de tratamiento es 2-60 min a temperatura ambiente. Después del pretratamiento, la superficie se lava con agua desmineralizada, pero no se seca.

- 25 El sustrato activado y lavado se transfiere a la disolución de deposición. La disolución de deposición tiene un pH no inferior a 8. Incluye una sal de metal seleccionada del grupo que consiste en una sal de plata, una sal de cinc y una sal de cobre. En una realización de la presente invención, la sal es nitrato de plata (AgNO_3). La sal de metal se usa en una cantidad eficaz no mayor de aproximadamente 0,10 g/l, preferiblemente aproximadamente 0,015 g/l. Si el contenido de metal es mayor que aproximadamente 0,10 g/l, el metal elemental puede formarse de manera no uniforme en la disolución o en las paredes del recipiente. Si el contenido de metal es menor que una cantidad eficaz, hay insuficiente metal para formar una película en el tiempo deseado.

- 30 Un segundo componente de la disolución de deposición es un agente de reducción que reduce la sal que contiene metal a metal elemental. El agente de reducción debe estar presente en una cantidad suficiente para llevar a cabo la reducción química. Los agentes de reducción aceptables incluyen formaldehído, sulfato de hidrazina, hidróxido de hidrazina y ácido hipofosfórico. En una realización de la presente invención, está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001 ml por litro de disolución. Una concentración demasiado grande del agente de reducción produce la deposición del metal en la disolución y sobre las paredes del recipiente, mientras que una concentración demasiado pequeña puede producir una formación insuficiente de metal sobre el sustrato. A la luz de esta descripción, mediante experimentación rutinaria, un experto en la técnica puede determinar la cantidad deseada de agente reductor.

- 35 Otro componente de la disolución de deposición es un agente de control de la deposición que está presente en una cantidad suficiente para ralentizar la reacción de deposición para prevenir que el metal reducido precipite directamente de la disolución en forma de un polvo metálico fino, o precipite sobre las paredes del recipiente. Los agentes de control de la deposición operables incluyen azúcar invertido, conocido también como invertosa, ácido succínico, citrato sódico, acetato sódico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, tartrato sódico, tartrato potásico y amoniaco. El agente de control de la deposición preferiblemente está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 g por litro de disolución. Si hay presente demasiado poco, se puede producir precipitación de los agregados de metal en lugar de una superficie metálica uniforme. Si hay presente demasiado, la sal que contiene metal se puede volver demasiado estable para la precipitación deseada sobre el sustrato de interés.

- 40 Las concentraciones del agente de reducción y el agente de control de la deposición se ajustan según sea necesario para lograr los resultados deseados, dependiendo del material del sustrato, el grosor de la película deseada, las

condiciones de deposición, y la concentración de metal en la disolución. Por ejemplo, para películas finas, la concentración de la sal de metal será relativamente baja, así como las concentraciones del agente de reducción y el agente de control de la deposición. A la luz de esta descripción, mediante experimentación rutinaria, un experto en la técnica puede determinar la cantidad deseada de agente de control de la deposición.

- 5 Al preparar la disolución de deposición, cada uno de los componentes de la disolución se disuelve preferiblemente de forma individual en agua desmineralizada. Las diferentes predisoluciones después se mezclan, y diluyen cuando sea necesario, en las cantidades correctas para lograr las concentraciones mencionadas antes.

La combinación de una sal de metal y agente de reducción permite que el metal sea reducido a partir de la sal a un estado adecuado para ser depositado sobre la superficie del sustrato. Este método es particularmente beneficioso para lograr una buena adhesión de la película metálica completada a la superficie del sustrato. La buena adhesión es importante en casi todos los usos.

La superficie del sustrato se expone a la disolución de deposición por cualquier procedimiento adecuado. Normalmente se prefiere la inmersión en la disolución, pero la disolución se puede aplicar por cualquier técnica conveniente tal como pulverización o pincelado. La película metálica se deposita uniformemente a partir de la disolución a una velocidad que se puede controlar por la concentración de la sal de metal. Si se requiere una película fina, la temperatura de deposición se mantiene suficientemente baja de modo que la deposición sea controlablemente lenta.

También se pueden aplicar en la presente invención otros métodos de aplicación de una capa metálica que actúa como una superficie donadora de electrones. Otros modos de lograr una superficie donadora de electrones son la deposición química de vapor y la pulverización catódica.

Después de la deposición de metal descrita antes, el sustrato tiene una superficie donadora de electrones que consiste en un metal. Esta deposición de metal solo es necesaria si el sustrato no tiene una superficie donadora de electrones desde el principio. Si el sustrato ya tiene una superficie donadora de electrones, se pueden depositar partículas metálicas sobre la superficie sin la adición extra de una capa metálica. En este último caso, el sustrato se limpia bien antes de la aplicación de las partículas.

La siguiente etapa en el método de fabricación es la deposición de partículas metálicas.

En una realización, se usan suspensiones coloidales de metales para obtener partículas que comprenden paladio y al menos otro metal sobre la superficie. Las partículas metálicas se depositan a partir de una suspensión de las partículas deseadas. La composición de las partículas metálicas en la suspensión se ajusta según el valor preferido. El sustrato con la superficie donadora de electrones se sumerge en la suspensión de partículas metálicas durante un periodo de tiempo de aproximadamente unos segundos a aproximadamente unos minutos o más tiempo.

La suspensión de partículas metálicas se puede fabricar de varias formas. En una realización, la suspensión de partículas metálicas se hace a partir de una disolución acuosa de una sal de metal que se reduce en condiciones tales que se forman partículas metálicas de un tamaño deseado. La mezcla de una cantidad adecuada de sal de metal, agente de reducción y agente estabilizante logra esto. Los mismos agentes de reducción y agentes estabilizantes descritos anteriormente se pueden usar cuando se hace la suspensión de partículas. A la luz de esta descripción, mediante experimentación rutinaria, un experto en la técnica puede determinar la cantidad deseada de agente de reducción y agente estabilizantes para lograr el tamaño de partículas deseado. En una realización alternativa se usa una suspensión coloidal de partículas metálicas disponible en el comercio. Se usan partículas metálicas de la composición deseada para hacer la suspensión.

En una realización, la suspensión de partículas metálicas se hace diluyendo con agua desmineralizada una disolución coloidal concentrada disponible en el comercio de partículas metálicas que comprenden paladio y al menos un metal seleccionado del grupo que consiste en oro, rutenio, rodio, osmio, iridio y platino. El sustrato se trata con la suspensión durante un periodo de tiempo desde aproximadamente unos segundos a aproximadamente unos minutos o más tiempo. Después del tratamiento, el sustrato se lava en un disolvente o agua tal como agua desmineralizada y se deja secar a temperatura ambiente.

En una realización particular no limitante, las partículas metálicas disponibles en el comercio consisten en 75% de paladio y 25% de oro.

Por lo tanto, según la presente invención se puede obtener un sustrato con una superficie particular deseada. Por ejemplo, se puede preparar un sustrato que tiene una superficie donadora de electrones de plata con partículas que consisten en 75% de paladio y 25% de oro, o una superficie donadora de electrones de cobre con partículas que consisten en 85% de paladio y 15% de rutenio.

Una de las ventajas que ofrece el método flexible aunque controlado y repetible para producir dichos sustratos, es que se puede producir una amplia variedad de sustratos. Como se describe además en la presente memoria, algunos sustratos tienen propiedades mejoradas frente a los sustratos existentes. Por ejemplo, un sustrato particular según la presente invención puede producir modificaciones sorprendentes y ventajosas de la hidrofobicidad de un

sustrato al que se aplica. Otras propiedades que se pueden modificar de esta forma mediante sustratos según la reivindicación 1, incluyen la adsorción de proteínas, crecimiento tisular, activación del complemento, respuesta inflamatoria, trombogenicidad, coeficiente de rozamiento y dureza de la superficie.

5 Es decir, se puede ajustar el tamaño de partículas, la composición de las partículas y la cantidad de partículas para modificar las propiedades superficiales de objetos a los que se aplica el sustrato.

Los autores de la presente invención han descubierto que se puede lograr esto usando un sustrato según la reivindicación 1. En particular, se puede ajustar el tamaño de partículas, la composición de las partículas y la cantidad de partículas para modificar las propiedades superficiales.

10 Los sustratos según la presente invención se pueden usar para muchos propósitos. Son adecuados para usar en cualquier aplicación donde se desee modificar la hidrofobicidad, adsorción de proteínas, crecimiento tisular, activación del complemento, respuesta inflamatoria, trombogenicidad, coeficiente de rozamiento y dureza de la superficie de un sustrato.

15 Las propiedades del sustrato se pueden tanto reducir como aumentar. Por lo tanto, se proporcionan objetos que presentan al menos una zona que potencia una característica y al menos una zona que reduce una característica. Un ejemplo es un objeto con una zona que reduce la adsorción de proteínas y una zona que potencia la adsorción de proteínas. Otro ejemplo es un objeto con una zona que reduce el crecimiento tisular y una zona que potencia el crecimiento tisular.

20 Un sustrato según la presente invención también comprende un sustrato que tiene una superficie donadora de electrones con partículas metálicas sobre dicha superficie, dichas partículas metálicas comprenden paladio y en donde la cantidad de dichas partículas metálicas es de 0,001 a 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

La presente invención proporciona el uso de un sustrato según la presente invención para modificar la adsorción de proteínas de un objeto que comprende dicho sustrato.

La presente invención proporciona el uso de un sustrato según la presente invención para modificar el crecimiento tisular sobre un objeto que comprende dicho sustrato.

25 La presente invención proporciona el uso de un sustrato según la presente invención para modificar la activación del complemento producida por un objeto que comprende dicho sustrato.

La presente invención proporciona el uso de un sustrato según la presente invención para modificar la respuesta inflamatoria producida por un objeto que comprende dicho sustrato.

30 La presente invención proporciona el uso de un sustrato según la presente invención para modificar la coagulación sanguínea producida por un objeto que comprende dicho sustrato.

Otra ventaja del sustrato según las reivindicaciones adjuntas es que proporciona una posibilidad para modificar el coeficiente de rozamiento. Por lo tanto, se proporciona el uso de un sustrato según la presente invención para modificar el coeficiente de rozamiento de un objeto que comprende dicho sustrato.

35 Otras características de la invención y sus ventajas asociadas serán evidentes para un experto en la técnica tras leer la descripción y los ejemplos.

Debe entenderse que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares mostradas aquí. Los siguientes ejemplos se proporcionan con propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención, puesto que el alcance de la presente invención está limitado solo por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

40 Ejemplos

Ejemplo 1

Hidrofobicidad de la superficie en función de la cantidad de partículas metálicas

45 Se depositó una capa uniforme de plata sobre un sustrato de vidrio según el siguiente método. El sustrato se sumergió en una disolución de limpieza de ácido crómico durante 5 min a 58°C, seguido de lavado en agua desmineralizada. La superficie del sustrato se activó por inmersión en una disolución acuosa de cloruro estannoso y después se lavó con agua desmineralizada. Después, la superficie del sustrato se metalizó con una capa uniforme de plata por inmersión en 3 disoluciones de deposición que comprendían iones de plata. Esto dio una superficie de plata con una cantidad aplicada de 1,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ que corresponde a un grosor de aproximadamente 115 Å. Posteriormente se depositaron partículas que consistían en 23% de paladio y 77% de oro sobre la primera superficie de plata por inmersión en una suspensión diluida que comprendía partículas metálicas de oro/paladio. La suspensión de partículas metálicas se hizo reduciendo una sal de oro y una sal de paladio con un agente de reducción y estabilizando la suspensión con un agente estabilizante. El sustrato posteriormente se lavó con agua

desmineralizada y se secó.

5 Se hicieron sustratos con diferentes cantidades de partículas depositadas usando el método resumido anteriormente. Las cantidades de partículas eran 0, 0,02, 0,11, 0,15 y 0,19 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Para la muestra con 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no se depositaron partículas sobre la superficie y por lo tanto consiste en una superficie de plata.

Se midió el ángulo de contacto estático de una gota de agua en equilibrio sobre diferentes sustratos. Se midieron los ángulos de contacto de avance y de retroceso usando la técnica de Wilhelmy.

La diferencia entre los valores del ángulo de contacto de avance y de retroceso se llama la histéresis del ángulo de contacto y se calculó para las mediciones. El resultado del experimento se representa en la tabla 1.

10 Tabla 1.

Cantidad de partículas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Ángulo de contacto estático (grados)	Histéresis del ángulo de contacto (grados)
0	52	70
0,02	50	77
0,11	56	75
0,15	62	80
0,19	62	84

Por lo tanto, la hidrofobicidad de la superficie del sustrato se modifica a la vez que la superficie presenta varias otras propiedades útiles, tales como biocompatibilidad, inherentes de los sustratos según este ejemplo.

Ejemplo 2

15 Adsorción de proteínas en función de la cantidad de partículas metálicas

20 Se depositó una capa uniforme de plata sobre un sustrato de dióxido de silicio. El sustrato se sumergió en una disolución de limpieza de ácido sulfúrico al 20% durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de lavado en agua desmineralizada. La superficie del sustrato se activó por inmersión en una disolución acuosa de cloruro estannoso y se lavó con agua desmineralizada. Después, la superficie del sustrato se metalizó con una capa uniforme de plata por inmersión en 4 baños de disoluciones de deposición que comprendían iones de plata. Esto dio una superficie de plata con una cantidad aplicada de 0,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ que corresponde a un grosor de aproximadamente 77 Å. Posteriormente se depositaron partículas que consistían en 95% de paladio y 5% de oro sobre la primera superficie de plata por inmersión en una suspensión diluida de partículas de Pd/Au. La cantidad aplicada de partículas metálicas era 0,05, 0,12, 0,48 y 0,59 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente. El sustrato se lavó en agua desmineralizada y se secó.

Se estudió la adsorción de fibrinógeno por la técnica de QCM-D. El fibrinógeno es una glucoproteína sintetizada en el hígado y se encuentra en el plasma sanguíneo. La QCM-D es una microbalanza de cristal de cuarzo con seguimiento de la disipación.

La cantidad de fibrinógeno adsorbida en función de las partículas metálicas aplicadas se muestra en la tabla 2.

30 Tabla 2

Cantidad de partículas de Pd/Au ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Adsorción de fibrinógeno ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
0,05	2,5
0,12	2,8
0,48	1,8
0,59	2,3

Ejemplo 3

Una red de tela de poliéster se lavó primero en una disolución de hidróxido potásico al 5% durante 5 min a 30°C. Después de lavados repetidos en agua desmineralizada, el sustrato se sumergió en una disolución acidificada de cloruro estannoso 1 g/l a temperatura ambiente durante 10 min. Después de lavado en agua desmineralizada se empapó en un baño de metalización que contenía sulfato de cobre 2 g/l, hidróxido sódico 5 g/l, citrato sódico 50 g/l y formaldehído 0,005 ml/l, durante 10 min a 35°C. Se obtuvo una capa de cobre de aproximadamente 200 Å y después de lavado de nuevo en agua desmineralizada, el sustrato se sumergió en una suspensión de partículas que comprendía 0,05 g/l de cada una de partículas de paladio y partículas de oro. La cantidad aplicada de partículas metálicas era 0,4 µg/cm².

10 Ejemplo 4

Un sustrato de PMMA se limpió en ácido clorhídrico al 5% durante 2 min y después se lavó con agua desmineralizada antes de sumergirlo en una disolución que contenía iones estannosos 0,02 g/l, a un pH de 2,5. Después de lavado, el sustrato se sumergió en una disolución que contenía iones de plata 0,005 g/l, amoníaco 0,02 ml/l, hidróxido potásico 0,05 g/l y formaldehído 0,0005 ml/l durante 5 min a temperatura ambiente. Esto dio una superficie con 0,12 µg/cm² de plata. Después de lavado se sumergió en una suspensión de partículas que comprendía partículas de paladio 0,005 g/l y de oro 0,002 g/l. La cantidad aplicada de partículas metálicas era 0,05 µg/cm².

Ejemplo 5

Un sustrato de poliimida no tejido se sumergió en una disolución de NaOH al 12% a 40°C durante 10 min. Después de lavados repetidos en agua desmineralizada se sumergió en una disolución alcohólica que contenía cloruro estannoso 0,5 g/l durante 5 min a temperatura ambiente. Después de lavar se empapó en un baño de cobre según el ejemplo 3. Se obtuvo una capa de cobre de 2 µg/cm². Después de lavado, se sumergió en una suspensión que comprendía partículas de Pd al 1% y de oro al 0,2%, calculado respecto al peso de la suspensión total. La cantidad aplicada de las partículas metálicas era 0,6 µg/cm².

25 Ejemplo 6

Se limpió una tela de nailon en NaOH al 5% durante 10 min a 40°C y después de lavado en agua desmineralizada se sumergió en una disolución de cloruro estannoso 0,6 g/l a pH 2,2, durante 15 min a temperatura ambiente. Después de esto, la superficie comprendía una cantidad de plata de 0,8 µg/cm². Después de un nuevo lavado se sumergió en un baño de plata según el ejemplo 2 y después tras nuevo lavado, se sumergió en una suspensión que comprendía partículas de Pd al 1% y de oro al 0,05%. La cantidad aplicada de partículas metálicas era 0,12 µg/cm².

Ejemplo 7

Un sustrato de aluminio se trató en una disolución de ácido nítrico al 10% y ácido fluorhídrico al 3% a 60°C durante 20 min. Después de lavado, el sustrato se sumergió en una disolución acidificada de cloruro estannoso 3 g/l y después de nuevo lavado en un baño de plata según el ejemplo 2. Después de esta etapa, se obtuvo una cantidad de aproximadamente 80 Å de plata sobre la superficie. Después de otro lavado, el sustrato se sumergió en una suspensión que comprendía partículas de Pd al 1% y de Au al 2%. La cantidad aplicada de partículas metálicas era 0,7 µg/cm².

Ejemplo 8

Un sustrato de PTFE se atacó en una disolución acuosa de hidróxido sódico durante 5 min. Después de lavar y secar, se sumergió en una disolución que contenía cloruro estannoso 0,7 g/l durante 20 min a temperatura ambiente. El sustrato después de lavado se sumergió en un baño de metalización que contenía nitrato de plata 0,2 g/l, amoníaco 0,5 ml/l e hidróxido sódico a pH 10,5, durante 5 min. Después de esta etapa, se obtuvo una cantidad de aproximadamente 2,2 µg/cm² de plata sobre la superficie. Después de un nuevo lavado, se sumergió en una suspensión que comprendía partículas de Pd al 3% y de Au al 0,1%, durante 5 min a temperatura ambiente. La cantidad aplicada de partículas metálicas era 0,03 µg/cm².

Ejemplo 9

Una placa de vidrio se lavó con ácido sulfúrico al 10% y ácido fluorhídrico al 1% a temperatura ambiente durante 15 min. Después de lavado, se sumergió en una disolución de fluoruro estannoso al 1%, y después de un nuevo lavado se sumergió en un baño de plata según el ejemplo 2. Después de esta etapa, se obtuvo una cantidad de aproximadamente 140 Å de plata sobre la superficie. Después lavado de nuevo, se sumergió en una suspensión que comprendía partículas de rutenio al 1% y de paladio al 2%. La cantidad aplicada de partículas metálicas era 0,25 µg/cm².

Ejemplo 10

Un sustrato de acero inoxidable se sumergió en una disolución de ácido nítrico al 15% y HF al 5% a temperatura

ambiente durante 30 min y después se lavó con agua desmineralizada. El procedimiento continuó siguiendo las etapas en el ejemplo 11. La cantidad aplicada de partículas metálicas era $0,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Ejemplo 11

- 5 Una varilla de titanio se limpió en una disolución de ácido nítrico al 18% y HF al 2% durante 20 min a temperatura ambiente. La aplicación de una superficie donadora de electrones y la aplicación de partículas metálicas se hizo como en el ejemplo 11. La cantidad aplicada de partículas metálicas era $0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Ejemplo 12

Detección de la activación del complemento inducida por superficie con microbalanza de cristal de cuarzo con seguimiento de la disipación (QCM-D)

- 10 La cuantificación de la respuesta a un cuerpo extraño se logra indirectamente controlando la unión de anticuerpos de conejo contra inmunoglobulina humana dirigidos contra el factor del complemento C3b unido a la superficie.

- 15 En el espacio de segundos desde la introducción en un tejido blando, un cuerpo extraño es sometido a una gran atención por el sistema del complemento. El sistema del complemento comprende aproximadamente 30 proteínas diferentes donde C3 es la más abundante. Después de una alta concentración de proteínas de fluidos corporales (es decir, albúmina, fibrinógeno y fibronectina) el sistema del complemento es uno de los primeros actores en la escena y tiene como objetivo proteger al hospedante de bacterias y hongos invasores, y también alertar al sistema inmunitario sobre un cuerpo extraño que entra en el sistema.

- 20 Sin estar ligado por ninguna teoría científica específica, los autores de la invención suponen que cuando el factor del complemento 3 (C3) se une a una superficie introducida es escindido por la C3 convertasa a la forma soluble C3a, y C3b unido a la superficie. El C3b unido a la superficie actuará entonces como una convertasa él mismo, produciendo la posterior escisión de C3 en forma de cascada. Los receptores para C3b se encuentran en eritrocitos, macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos B, todos los cuales son importantes para controlar la inflamación y curación de heridas en tejidos. Los mecanismos exactos que controlan la unión de C3 a la superficie son todavía muy desconocidos. Sin embargo, los anticuerpos dirigidos específicamente hacia C3b se pueden medir fácilmente in vitro con QCM-D y dan información cuantitativa de propiedades de la respuesta inmunitaria al biomaterial. Esta nueva metodología muestra una buena concordancia con todos los demás métodos conocidos para detectar C3b unido a la superficie.

Material y métodos

Preparación de superficies

- 30 Como superficies modelo se usaron cristales de QCM-D estándar tratados por pulverización catódica con Au (s), Ti (s) (Qsx301 y Qsx310 respectivamente). Se aplicó un recubrimiento según la presente invención sobre cristales de SiO_2 de QCM-D estándar (Qsx 303, Q-Sense, Suecia) usando el método resumido en el ejemplo 2.

Productos sanguíneos

- 35 Los autores de la invención recibieron sangre entera reciente de 5 donantes sanos (Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Suecia). La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 h para obtener el suero activo al complemento. Después el suero se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min (Hettich Universal 16 R) después de lo cual el líquido sobrenadante se separó y se volvió a centrifugar como antes y se almacenó a -70°C . Para detectar la activación del complemento inducida por la superficie, el suero se diluyó 1:5 en disolución salina tampón Veronal complementada con CaCl_2 (0,15 mM) y MgCl_2 (0,5 mM) (VBS^{++}), y se siguió durante 20 min la adsorción de las proteínas del suero a los cristales QCM-D modificados seguido de un lavado con tampón durante 5 min. Al lavado le siguió la adición de anticuerpos de conejo contra C3b humano diluidos 1:20 en VBS^{++} (Sigma). Para los controles negativo y positivo se usaron cristales QCM-D estándar con oro previamente recubiertos con IgG humana (1 mg/ml) (Sigma). El control negativo se inactivó con calor a 56°C durante 30 min antes de las mediciones.

- 45 Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en disolución salina tampón Veronal con CaCl_2 (0,15 mM) y MgCl_2 (0,5 mM) (VBS^{++}), excepto para los controles negativos donde se usó VBS^- . Todas las mediciones de QCM-D se hicieron en el aparato D300 (Q-sense, Suecia).

Resultados

- 50 Las superficies de SiO_2 recubiertas como se ha descrito anteriormente tenían una cantidad de plata de $0,35\text{-}0,61 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. La cantidad de oro en las partículas se varió de acuerdo con la siguiente tabla y la activación del complemento se midió de acuerdo con la tabla.

ES 2 447 466 T3

Muestra	Cantidad de Au ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	C3b (ng/cm^2)
Muestra nº 1	0,09	677
Muestra nº 2	0,41	991
Control neg.	-	109
Control pos.	-	1832
Titanio (control)	-	632

Ejemplo 13

Adhesión de plaquetas y producción de factor del complemento C3a soluble sobre superficies de biomaterial

5 El consumo de plaquetas en sangre entera reciente expuesta a un biomaterial se usa para cuantificar la trombogenicidad de un biomaterial deseado. Además, la fracción soluble del factor del complemento 3 activado (C3a) se usa para el seguimiento de la activación del complemento de la superficie de biomaterial.

Antecedentes

10 Las plaquetas (o trombocitos) son fragmentos pequeños de células sin núcleo con forma de disco normalmente presentes en la sangre sana. Tienen una función crucial en la conservación de las paredes en los vasos sanguíneos y son reclutadas en una zona dañada y activadas para formar un coágulo, que previene la hemorragia y la pérdida de sangre. También se sabe que las plaquetas se adhieren y se convierten en activadas sobre algunas superficies de biomateriales, formando a veces un coágulo indeseado y potencialmente peligroso. El C3a soluble es una proteína pequeña escindida del factor del complemento 3 (C3) cuando este se une y se activa en una bacteria o la superficie de un cuerpo extraño. C3a actúa como un factor quimiotáctico para monocitos polimorfonucleares (PMN) y
15 también tiene propiedades anafilótóxicas que señalan la liberación de histamina de los mastocitos.

Material y métodos

Cámaras experimentales

20 La cámara experimental está construida brevemente con dos anillos de PMMA pegados sobre un portaobjetos de PMMA, construyendo dos pocillos. Después de añadir la sangre entera, el material que se va a ensayar se pone como una tapa sobre los dos pocillos y se mantiene en la posición con una pequeña pinza. Después, la cámara se monta en un disco giratorio en agua a 37°C durante 60 min a 22 rpm.

Sangre

25 Se extrajo sangre de un donante sano y se recogió en un vial heparinizado 2x que contenía heparina soluble (Leo Pharma), para dar una concentración final de 1,0 UI de heparina/ml. La sangre recogida después se transfirió inmediatamente a las cámaras experimentales.

Recuento de plaquetas

Después de incubación en la cámara experimental, se añadió EDTA (Fluka) a la sangre hasta una concentración final 4 mM. Después las plaquetas se contaron en un contador de células automático Coulter AcT diff™ (Coulter Corporation).

30 Análisis de C3a

Después del recuento de plaquetas, la sangre se centrifugó a 4600 g durante 10 min a +4°C y el líquido sobrenadante (plasma) se guardó y almacenó a -70°C antes de las mediciones.

35 El plasma se diluyó 1/300 y se analizó en un ELISA tipo sándwich que usa 4SD17.3 monoclonal (Uppsala university, Suecia) como anticuerpo de captura. El C3a unido se detectó con anticuerpo de conejo contra C3a humano biotinilado (Dako), seguido de HRP conjugada con estreptavidina (Amersham Biosciences). El suero activado con zimósán, calibrado frente a una disolución de C3a purificado, sirvió como patrón.

Resultados

Los objetos recubiertos fabricados siguiendo el método resumido en el ejemplo 2 sobre vidrio, tenían una concentración de plata en la superficie de aproximadamente 1,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Muestra	Cantidad de paladio ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Número de plaquetas ($\times 10^9$)	C3a ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Vidrio no recubierto	-	29	681
Vidrio recubierto variación 1	0	170	337
Vidrio recubierto variación 2	0,01	190	287

Recuento de plaquetas en sangre y adsorción de C3a. Los recubrimientos sobre el vidrio tenían una concentración de plata en la superficie de aproximadamente $1,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Muestra	Cantidad de oro ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Número de plaquetas ($\times 10^9$)	C3a ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Vidrio no recubierto	-	29	681
Vidrio recubierto variación 3	0,01	166	376
Vidrio recubierto variación 4	0,01	141	271

5 Ejemplo 14

Medición de la respuesta inflamatoria

Material

NHSp-2 (Mezcla de sueros humanos normales del Immunologisk institutt, Rikshospitalet, Oslo, Noruega), suero de donantes sanos.

10 Tubos de 30 cm hechos de PDMS (polidimetilsiloxano) se recubrieron de acuerdo con el procedimiento resumido en el ejemplo 2. Se usaron tubos de PVC de 30 cm como control.

Configuración: 7 tipos de tubos, no tratados y de PVC por triplicado (en total 21).

Método

1) El suero se puso sobre hielo.

15 2) Se separó una muestra cero. Se añadieron $750 \mu\text{l}$ directamente a un tubo con $15 \mu\text{l}$ de EDTA 0,5 M. La muestra se mantuvo sobre hielo.

3) Se añadieron $750 \mu\text{l}$ de suero a cada tubo.

4) Los tubos se unieron a un rotor (5 rpm) a 37°C y se incubaron durante 30 min.

20 5) El suero se separó con una pipeta y se añadió a un tubo con $15 \mu\text{l}$ de EDTA 0,5 M. Las muestras se pusieron sobre hielo y se analizaron con respecto al TCC (el complejo del complemento C5b-9 terminal soluble).

El TCC se analizó usando un inmunoensayo enzimático de anticuerpo doble basado en el anticuerpo monoclonal aE11, muy específico para un neoepítipo expuesto en C9 activado pero no natural, como anticuerpo de captura. El método se describió originalmente en:

25 Mollnes TE, Lea T, Frøland SS, Harboe M. "Quantification of the terminal complement complex in human plasma by an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against a neoantigen of the complex", *Scand. J. Immunol.* 22:197-202. 1985.

y se modificó posteriormente en:

30 Mollnes TE, Redl H, Høgåsen K, Bengtsson A, Garred P, Speilberg L, Lea T, Oppermann M, Götze O, Schlag G. "Complement activation in septic baboons detected by neoepitope specific assays for C3b/iC3b/C3c, C5a and the terminal C5b-9 complement complex (TCC)", *Clin. Exp. Immunol.* 91:295-300. 1993.

Resultados:

La cantidad de concentración de plata en la superficie era $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

ES 2 447 466 T3

Muestra nº	Cantidad de Pd ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	TCC (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)
1	0,47	5,85	1582,13
2	0,70	5,16	1724,33
3	1,48	4,60	2136,79
Tubo de PDMS no recubierto	No recubierto	3,88	728,33
Tubo de PVC no recubierto, control	No recubierto	6,21	1750,23

La cantidad de plata en la superficie era $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Muestra nº	Cantidad de Au ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	TCC (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)
4	0,14	5,24	1652,62
5	0,32	6,51	1264,40
Tubo de PDMS no recubierto	No recubierto	3,88	728,33
Tubo de PVC no recubierto, control	No recubierto	6,21	1750,23

Ejemplo 15

5 Adhesión celular in vitro e in vivo

Se usaron fibroblastos dérmicos humanos normales primarios (NHDF, Karocell Tissue Engineering AB, Estocolmo, Suecia), pase 7. Las células se cultivaron en matraces de cultivo tisular en medio de fibroblastos completo que contenía DMEM+GlutaMAX™-1 (Gibco, Reino Unido), suero bovino fetal al 10% (FBS, Gibco, Reino Unido) y antibiótico-antimicótico al 1% (Gibco, Reino Unido) a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Se recubrieron 10 sustratos diferentes de dióxido de silicio siguiendo el método resumido en el ejemplo 2 y se perforaron de forma estéril discos con un diámetro de 15 mm para ajustarse en una placa de 24 pocillos. Los discos se sumergieron en PBS estéril (disolución salina tamponada con fosfato, Gibco, Reino Unido) y se dispersó 1 ml de suspensión celular (17000 células/ml) sobre los discos de dióxido de silicio y en pocillos de PS vacíos (poliestireno, Falcon, BD Biosciences, Bélgica) y se incubaron durante 24 h y 72 h por triplicado. Se recogieron los medios de todas las muestras, se centrifugaron a 400g, 5 min y se almacenaron a -70°C para análisis de ELISA (ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas) de los factores liberados por las células. Se incubaron 2 discos de cada material con medio completo sin células para calcular los valores base.

Cantidad de células

La cantidad de células asociadas con las superficies y el medio que las rodea se determinó por un sistema NucleoCounter® (ChemoMetec A/S, Dinamarca). Brevemente, las células se trataron con tampón de lisis y tampón de estabilización (proporcionado con el sistema). Las muestras lisadas se cargaron en un NucleoCassette™ previamente recubierto con yoduro de propidio fluorescente que tiñe los núcleos celulares, y después se cuantificaron en el NucleoCounter®.

Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó midiendo el contenido de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio, un marcador de lesión de la membrana celular, usando evaluación espectrofotométrica de la conversión mediada por la LDH del ácido pirúvico a ácido láctico (C- Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Suecia).

Determinación de citoquinas

La cantidad de TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante beta 1) y de colágeno de tipo I se detectaron mediante kits de ELISA (TGF- β 1 humano, Quantikine®, R&D Systems, Reino Unido; ELISA KIT de colágeno humano de tipo 1, Cosmo Bio Co., Japón) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en un lector de ELISA SpectraVmax (Molecular Devices, Reino Unido).

In vivo

Se recubrieron 6 sustratos diferentes de dióxido de silicio (10 mm de diámetro) usando el método resumido en el ejemplo 2 y se esterilizaron. Ratas Sprague-Dawley hembra (200-250 g), alimentadas con una dieta estándar de

5 pellets y agua, se anestesiaron con una mezcla de isoflurano al 2,7% y aire (Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Malta) y se les suministró 0,01 mg de Temgesic como analgésico, por vía s.c. previamente a la operación. Las ratas se afeitaron y se limpiaron con clorhexidina 5 mg/ml en etanol al 70% y cada rata recibió uno de cada uno de los tipos de implante por vía subcutánea (s.c.) en la espalda. Las heridas se cerraron con 2 suturas (Ethilon 5-0 FS-3, Ethicon®, Johnson & Johnson, Bélgica). Los periodos de implantación fueron 1 y 3 días para evaluar el proceso inflamatorio temprano y 21 días para el examen de la formación de cápsula fibrosa y la respuesta inflamatoria tardía (n = 8 ratas por periodo de tiempo). Cuando se llevó a cabo la explantación, los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital (60 g.l⁻¹) después de anestesia corta con una mezcla de isoflurano al 2,7% y aire. Se recogieron los implantes y los exudados de alrededor. Las células exudadas se obtuvieron de las 10 cavidades por aspiración repetida de HBBS (disolución salina equilibrada de Hank, Gibco, Reino Unido) y se mantuvieron en hielo. Los exudados se centrifugaron a 400g, 5 min y los líquidos sobrenadantes se conservaron a -70°C. Todos los estudios de implantación fueron aprobados por el Comité ético local para animales de laboratorio.

Cantidad de células y tipo de células

15 La concentración y el tipo de células en los exudados (células/ml) se contaron por microscopía óptica con tinción de Türk en una cámara Bürker y la cantidad de células en exudados centrifugados y en implantes se determinó por el sistema NucleoCounter®.

Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por exclusión con tinta azul de trypan usando microscopía óptica y por evaluación de LDH (C-Laboratory, Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Suecia).

20 Determinación de citoquinas

25 La cantidad de TGF-β1 (Factor de crecimiento transformante beta 1) y MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) se detectaron mediante kits de ELISA (TGF-β1 de rata, Quantikine®, R&D Systems, Reino Unido; proteína quimiotáctica de monocitos 1 de Amersham [(r)MCP-1], Rata, Biotrak ELISA System, GE Healthcare, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en un lector de ELISA SpectraVmax (Molecular Devices, Reino Unido).

Resultados del estudio in vitro

La cantidad de metales sobre el objeto de ensayo era, Ag: 0,8-0,9 µg/cm² y Pd: 0,1 µg/cm².

Concentración de Au en la superficie (µg/cm ²)	Número de células después de 72 h
0,05	5500
0,34	9400
0,43	16200

30 En el segundo conjunto experimental, la cantidad de metales sobre el objeto de ensayo era, Ag: 0,8-0,9 µg/cm² y Au: 0,05-0,09 µg/cm².

Concentración de Pd en la superficie (µg/cm ²)	Número de células después de 72 h
0,1	5500
0,27	8600
0,69	9900

Resultados del estudio in vivo

La cantidad de Pd sobre los discos in vivo se varió. La cantidad de Ag era aproximadamente 1 µg/cm² para todas las muestras. (PMN = polimorfonuclear)

ES 2 447 466 T3

Cantidad de Pd ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% de células PMN en exudado, 1 día	% de células PMN en exudado, 3 días	% de células PMN en exudado, 21 días
PDMS no recubierto control	33	2	1
0	17	2	1
0,07	32	2,5	inferior a 1
0,86	26	2	inferior a 1

Cantidad de Pd ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Cantidad total de MCP-1, 1 día (pg/ml)	Cantidad total de MCP-1, 3 días (pg/ml)	Cantidad total de MCP-1, 21 días (pg/ml)
PDMS no recubierto control	4600	500	100
0	2050	700	350
0,07	4500	500	200
0,86	3300	600	200

Cantidad de Pd ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Cantidad total de TGF-1, 1 día (pg/ml)	Cantidad total de TGF-1, 3 días (pg/ml)	Cantidad total de TGF-1, 21 días (pg/ml)
PDMS no recubierto control	62	1	10
0	3	8	12
0,07	82	33	11
0,86	25	8	20

5 La cantidad de Au sobre los discos in vivo se varió. La cantidad de Ag era aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para todas las muestras. (PMN = polimorfonuclear)

Cantidad de Au ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% de células PMN en exudado, 1 día	% de células PMN en exudado, 3 días	% de células PMN en exudado, 21 días
PDMS no recubierto control	33	2	1
0,01	32	2,5	1
0,43	18	5	1,5
0,64	20	4	inferior a 1

ES 2 447 466 T3

Cantidad de Au ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Cantidad total de MCP-1, 1 día (pg/ml)	Cantidad total de MCP-1, 3 días (pg/ml)	Cantidad total de MCP-1, 21 días (pg/ml)
PDMS no recubierto control	4600	500	100
0,01	4500	500	200
0,43	3100	450	200
0,64	2800	500	150

Cantidad de Au ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Cantidad total de TGF-1, 1 día (pg/ml)	Cantidad total de TGF-1, 3 días (pg/ml)	Cantidad total de TGF-1, 21 días (pg/ml)
PDMS no recubierto control	62	1	10
0,01	82	33	11
0,43	6	5	20
0,64	28	8	9

REIVINDICACIONES

- 1.- Un sustrato biocompatible que tiene una superficie donadora de electrones en donde dicha superficie donadora de electrones es un metal seleccionado del grupo que consiste en plata, cobre y cinc, caracterizado porque hay partículas metálicas sobre dicha superficie, dichas partículas metálicas comprenden paladio y al menos un metal
5 seleccionado del grupo que consiste en oro, rutenio, rodio, osmio, iridio y platino, y en donde la cantidad de dichas partículas metálicas es de 0,001 a 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en donde las partículas son partículas o agregados distribuidos uniformemente sobre dicha superficie donadora de electrones.
- 2.- El sustrato según la reivindicación 1, en donde dicha superficie donadora de electrones es una capa de un material donador de electrones que se aplica en una cantidad de 0,05 a 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.
- 10 3.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho sustrato es un sustrato polimérico.
- 4.- El sustrato según la reivindicación 3, en donde dicho sustrato polimérico se selecciona del grupo que consiste en un polímero natural, un polímero degradable, un polímero comestible, un polímero biodegradable, un polímero que no daña el medio ambiente, un polímero de calidad médica, látex, vinilo, polímeros que comprenden grupos
15 de etileno y acetato de vinilo, poliuretano-urea, silicona, poli(cloruro de vinilo), polipropileno, estireno, poliuretano, poliéster, copolimerizados de etileno y acetato de vinilo, poliestireno, policarbonato, polietileno, poliacrilato, polimetacrilato, acrilonitrilo-butadieno-estireno, poliamida y poliimida, o mezclas de los mismos.
- 5.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho sustrato es un metal.
- 6.- El sustrato según la reivindicación 5, en donde dicho metal se selecciona del grupo que consiste en acero inoxidable, acero de calidad médica, titanio, titanio de calidad médica, cobalto y cromo, o mezclas de los mismos.
- 20 7.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho sustrato se selecciona del grupo que consiste en vidrio, minerales, zeolitas, piedra, cerámicas, papel, madera, fibras tejidas, fibras, fibras de celulosa, cuero, carbono, fibras de carbono, grafito, politetrafluoroetileno y poliparafenilentereftalamida.
- 8.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho sustrato tiene la forma de una partícula.
- 25 9.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la cantidad de las partículas metálicas es de 0,01 a 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.
- 10.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la relación de paladio a metales que no son paladio en dichas partículas metálicas es de 0,01:99,99 a 99,99:0,01.
- 30 11.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dichas partículas metálicas, además de paladio, comprenden oro.
- 12.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde dichas partículas metálicas tienen un tamaño medio de 10-10000 Å, preferiblemente 100-600 Å.
- 13.- Un objeto que comprende un sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicho objeto se selecciona del grupo que consiste en un dispositivo médico, un artículo desechable y un artículo dental.
- 35 14.- El sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para al menos uno de los siguientes usos:
- modificar la adsorción de proteínas de un objeto que comprende dicho sustrato,
 - modificar el crecimiento tisular sobre un objeto que comprende dicho sustrato,
 - modificar la activación del complemento producida por un objeto que comprende dicho sustrato,
 - modificar la respuesta inflamatoria producida por un objeto que comprende dicho sustrato,
 - 40 - modificar la coagulación sanguínea producida por un objeto que comprende dicho sustrato,
 - modificar el coeficiente de rozamiento de un objeto que comprende dicho sustrato; y
 - modificar la dureza de la superficie de un objeto que comprende dicho sustrato.
- 15.- Un método para la fabricación de un sustrato según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que comprende las etapas:
- 45 a. depositar partículas metálicas a partir de una suspensión sobre dicho sustrato,
- b. lavar dicho sustrato, y

c. secar dicho sustrato.

16.- Un método según la reivindicación 15, que además comprende la etapa de depositar un material donador de electrones sobre dicho sustrato antes de la deposición de partículas metálicas.