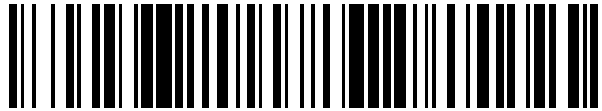


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 035**

21 Número de solicitud: 201730591

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)
A61L 27/44 (2006.01)
A61B 18/18 (2006.01)
A61L 2/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.10.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA- Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**ALVAREZ LORENZO, Carmen Isabel;
CABANA MONTENEGRO, Sonia;
BARBOSA FERNANDEZ, Silvia;
TABOADA ANTELO, Pablo y
CONCHEIRO NINE, Angel**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASÁNCHEZ, Susana

54 Título: **PRODUCTO SANITARIO PARA TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO MEDIANTE FOTOTERMIA**

57 Resumen:

Producto sanitario para tratamiento antimicrobiano mediante fototerapia. La invención se refiere a un sistema que sometido a una luz es capaz de matar las bacterias o los hongos del entorno. Más concretamente, se trata de un sistema para inserción o implante en organismos vivos que comprende un sustrato injertado con un polímero, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie de dicho sustrato.

ES 2 637 035 A1

DESCRIPCIÓN

Producto sanitario para tratamiento antimicrobiano mediante fototerapia

Sector de la técnica

La invención se refiere a un material para destruir microorganismos. Más concretamente, se refiere a un material con efecto fototérmico que es capaz de matar microorganismos de su superficie o su entorno.

Antecedentes de la invención

Los componentes poliméricos de los productos sanitarios que se emplean como insertos o implantes son fácilmente colonizados por microorganismos, creando un foco de infección desde el que pueden migrar a otras partes del cuerpo. Además, estos microorganismos que colonizan dichos productos sanitarios pueden formar un biofilm que actúa como barrera a agentes antimicrobianos y favorece la aparición de microorganismos resistentes a antibióticos. Así, se ha trabajado en el desarrollo de productos sanitarios que incorporan una tecnología que elimine los microorganismos que podrían colonizarlos.

Una estrategia muy reciente es el recubrimiento de componentes poliméricos con nanoestructuras (de tamaño y forma adecuados) de oro, que al ser irradiados con una radiación de frecuencia en la región del infrarrojo cercano experimentan un calentamiento local capaz de matar microorganismos. Khantamat et al. (Appl.Mat.Interf. 7 (2015) 3981-3993), han descrito la irradiación de nanoesferas adheridas a la superficie de un catéter modelo como método para matar la bacteria *Enterococcus faecalis*. Sin embargo, para anclar las nanoesferas a la superficie del catéter fue necesaria la funcionalización previa de las nanopartículas de oro con ligandos orgánicos que contienen azufre, y la funcionalización previa del sustrato empleado, polidimetilsiloxano, con cadenas que tienen grupos amino terminales. Y entonces mediante una reacción química anclaron covalentemente las nanopartículas de oro modificadas al sustrato modificado. La preparación de este catéter modelo requiere varias etapas de funcionalización y posterior reacción química, lo cual alarga y hace más complejo el proceso. Además, después de irradiar 10 minutos, se alcanzó una temperatura media de 73°C, que es muy elevada si se pretende emplear este producto como un producto sanitario implantable.

Cabe destacar que en otras investigaciones en las que se ha empleado una multicapa preparada mediante la técnica de deposición capa a capa de polímeros de poli(hidrocloruro de alilamina), poli(fluorescein isocianato hidrocloreto de alilamina) y poli(4-estirenosulfonato sódico), intercalando capas de nanopartículas de oro preformadas, el incremento de temperatura tras la irradiación de este material es elevado y no es controlable, llegando incluso a formarse burbujas de vapor de agua cuando el material está en un medio acuoso (Adv.Funct. Mater. 22 (2012) 294-303). Estos resultados hacen inviable el uso de este material como producto sanitario implantable.

Abdou Mohamed et al. (Biomaterials 97 (2016) 154-163) utilizan una combinación de un polímero termosensible y biocompatible con nanobarras (*nanorods*) de oro para matar bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las nanobarras de oro fueron preparadas mediante una modificación con bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) y recubiertas con polietilenglicol para evitar los efectos tóxicos del compuesto de amonio empleado. Además del empleo de CTAB, el producto final tiene el inconveniente de que al irradiarlo para matar las bacterias se produce un incremento de temperatura de hasta 25°C, que es muy elevado teniendo en cuenta una temperatura basal de 36°C. Además el incremento tan elevado de temperatura cambia la forma de las nanobarras impidiendo la reutilización del sistema debido al desplazamiento de la banda plasmónica.

De acuerdo a lo descrito, todavía es necesario desarrollar materiales adecuados para ser usados como componentes de productos sanitarios que por efecto de una radiación experimenten un incremento controlado de temperatura que permita eliminar microorganismos sin causar daño al personal que lo utilice o a la persona o al animal en el que se encuentre colocado/insertado/implantado el producto sanitario, de manera que el material se pueda preparar mediante un método sencillo, evitando componentes tóxicos y que el incremento de temperatura se regule de manera precisa.

Descripción breve de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un producto adecuado para ser empleado como producto sanitario en terapia fototérmica. Más en concreto, han desarrollado un sistema adecuado para ser colocado, insertado o implantado en un

- organismo vivo, que al ser irradiado con luz aumenta la temperatura de su superficie y del medio en el que se encuentra y el calor liberado es capaz de matar microorganismos, como bacterias y hongos. El sistema presenta la ventaja de que al irradiar, el incremento de temperatura está controlado y además es adecuado para no producir quemaduras o molestias en el organismo en el que se encuentra insertado o implantado. El incremento de temperatura que se ha detectado para los sistemas de la invención es inferior a 10°C (ver ejemplo 4). Así, una ventaja adicional de la invención es que el incremento moderado de la temperatura hace que las nanopartículas no se deterioren, de modo que es posible utilizar el sistema de la invención en posteriores irradiaciones.
- 5
- 10 Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un sistema para colocación, inserción o implante en organismos vivos que comprende un sustrato injertado con un polímero, y nanopartículas de oro en la superficie de dicho sustrato.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para preparar los sistemas de la invención.

- 15 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un producto sanitario que comprende el sistema de la invención.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de los sistemas de la invención como antibacterianos o antimicóticos.

20 **Descripción de las figuras**

- Figura 1. Dependencia del porcentaje de injerto de ácido acrílico (AAc) sobre la película de goma de silicona (SR) en función de (a) la temperatura para una dosis absorbida de 40 kGy, una concentración del monómero del 50%v/v en tolueno y 180 minutos de tiempo de reacción; (b) dosis absorbida a 60°C, 180 minutos de reacción y una concentración del monómero del 50%v/v en tolueno; (c) tiempo de reacción para una dosis de 40 kGy, una concentración del monómero del 50%v/v en tolueno a 60°C; y (d) concentración del monómero para una dosis de 40 kGy, una concentración del monómero del 50%v/v en tolueno y 180 minutos de reacción a 60°C.
- 25

Figura 2. Fotografías de las películas SR y SR-g-AAc con 38% y 61% de injerto después de a) agitar en 10mM H_{Au}Cl₄ durante 18h a 20°C, seguido de b) adición de 20 mM NaBH₄ y lavado con agua; y c) agitar en 10 mM H_{Au}Cl₄ durante 18 h a 60°C, seguido de d) adición de 20mM NaBH₄ y lavado con agua.

- 5 Figura 3. Registro del incremento de temperatura a) en una dispersión de nanopartículas de oro y b) en películas de SR y SR-g-AAc injertadas al 14% y 38% antes (símbolos vacíos) y después de la inmovilización de nanopartículas de oro (símbolos llenos) durante irradiación con un láser de 514 nm (0,5W/cm²).

- 10 Figura 4. Unidades de formación de colonias (UFC) de *Staphylococcus aureus* adheridas a películas SR y SR-g-AAc con y sin nanopartículas de oro inmovilizadas en la superficie (preparadas según el ejemplo 3).

- 15 Figura 5. Espectro de UV-Vis de nanopartículas de oro preparadas en el ejemplo 2, nanopartículas de oro liberadas de la película SR-g-AAc con 38% de injerto al medio acuoso y una película SR-g-AAc con 38% de injerto con nanopartículas de oro inmovilizadas, tras autoclavado.

Descripción detallada de la invención

- 20 Un primer aspecto de la invención se refiere a un sistema para colocación, inserción o implante en organismos vivos que comprende un sustrato injertado con un polímero, y nanopartículas de oro en la superficie de dicho sustrato.

Los sistemas de la invención son adecuados para ser colocados, insertados o implantados en seres vivos. Así, todos los materiales que sean incompatibles con este uso particular quedan excluidos de la invención, como por ejemplo el vidrio.

- 25 Se entiende por “sustrato”, aquel que sirve como asiento para los demás componentes del sistema. En una realización particular, el sustrato que se emplea en los sistemas de la invención se selecciona de entre goma de silicona, poliuretano, polipropileno, polietileno, polietilentereftalato, cloruro de polivinilo, nylon, acetato de celulosa, ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), y poliuretano.

En el sistema de la invención, el sustrato está injertado con un polímero. Para los propósitos de la invención, el polímero injertado es un polímero biocompatible.

En una realización particular, el polímero injertado en el sustrato se selecciona de entre ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido cítrico reticulado, carboximetil celulosa, dextrano sulfato, agar agar, ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), polímeros
5 derivados del ácido maléico, ácido poli(4-hidroxibenzoico), ácido poli(3-hidroxibutírico), ácido poli(itacónico), y ácido poli(estirenosulfónico).

El porcentaje de injerto de polímero sobre el sustrato puede variar dependiendo de las condiciones empleadas en el proceso. Un porcentaje adecuado para los propósitos de la
10 invención es entre 8% y 120%, más preferible entre 13% y 100%, más preferiblemente entre 10% y 65%. Teniendo en cuenta que cuando el material tiene mayor grado de injerto, se depositan menor cantidad de nanopartículas, entonces una realización preferida de la invención es de entre 10% y 45%.

El sistema de la invención que comprende un sustrato con un polímero injertado,
15 comprende además nanopartículas de oro que están depositadas en su superficie.

Sorprendentemente, las nanopartículas de oro preparadas previamente no se depositaron sobre el sustrato tras un periodo de incubación, como se demuestra en el ejemplo 2. Solamente cuando las nanopartículas de oro se prepararon in situ en presencia del sustrato injertado fue factible el recubrimiento del sustrato. Además, dichas nanopartículas de oro
20 así preparadas no están modificadas ni recubiertas por alguna sustancia.

Las nanopartículas de oro depositadas sobre el sustrato tienen un tamaño medio de entre 500 nm y 1 nm, preferiblemente entre 100 nm y 1 nm, más preferiblemente entre 50 nm y 1 nm, aún más preferiblemente entre 35 nm y 1 nm.

En una realización particular, el sistema de la invención comprende una goma de silicona injertada con un polímero biocompatible, y nanopartículas de oro depositadas en la
25 superficie, con un tamaño medio de las nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm, preferiblemente entre 100 nm y 1 nm.

En otra realización particular, el sistema de la invención comprende un sustrato como se ha descrito previamente injertado con ácido poliacrílico, y nanopartículas de oro

depositadas en la superficie, con un tamaño medio de las nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm, preferiblemente entre 100 nm y 1 nm.

En otra realización particular, el sistema de la invención comprende una goma de silicona injertada con ácido poliacrílico, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie, con
5 un tamaño medio de las nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm, preferiblemente entre 100 nm y 1 nm.

En otra realización particular, el sistema de la invención comprende una goma de silicona injertada con ácido poliacrílico con un porcentaje de injerto de entre 8% y 120%, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie, con un tamaño medio de las
10 nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm, preferiblemente entre 100 nm y 1 nm.

En otra realización particular, el sistema de la invención comprende una goma de silicona injertada con ácido poliacrílico con un porcentaje de injerto de entre 10% y 65%, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie, con un tamaño medio de las nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm, preferiblemente entre 100 nm y 1 nm.

15

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar el sistema de la invención como se ha descrito anteriormente, que comprende:

- a) poner en contacto un sustrato injertado con un polímero con ácido cloro aúrico o una sal de oro en medio acuoso,
- 20 b) opcionalmente añadir un reductor.

Sorprendentemente, las nanopartículas de oro se forman durante la etapa a) del procedimiento de forma espontánea, como se demuestra en el ejemplo 3. Aunque si se busca un depósito mayor de nanopartículas se puede optar por realizar además la etapa b). Tras la etapa b) la cantidad de nanopartículas de oro depositada es superior que en la etapa
25 a).

El procedimiento de la invención tiene la ventaja de que las nanopartículas se forman de manera directa sobre el sustrato, no es necesario preformarlas ni modificarlas previamente.

Esto hace que el procedimiento de la invención sea sencillo y transcurra en una única etapa.

La etapa a) transcurre en agitación a una temperatura de entre 15 y 70°C, preferentemente entre 15 y 60°C. El depósito espontáneo que se produce en esta etapa es mayor cuando la
5 temperatura está entre 15 y 30°C, más preferiblemente a 20°C.

El grado de injerto del sustrato puede variar entre 8% y 120%, más preferible entre 13% y 100%, más preferiblemente entre 10% y 65%. Teniendo en cuenta que cuando el material tiene menor grado de injerto, se deposita mayor cantidad de nanopartículas, entonces una realización preferida de la invención es de entre 10% y 45%.

10 En la etapa b) se produce una reducción del compuesto de oro y se forman masivamente nanopartículas que se depositan en el sustrato injertado. El reductor será un reductor habitual de la industria química como por ejemplo borohidruro sódico, hidruro de litio aluminio, tiosulfito sódico o potásico, citrato sódico. Preferiblemente la reacción transcurre en condiciones suaves. De manera preferida el reductor es borohidruro sódico.

15 El procedimiento puede incluir además un paso intermedio entre la etapa a) y la etapa b) en el que se elimina el medio acuoso y se añade agua.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a un sistema obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente.

En un tercer aspecto, la invención se dirige a un producto sanitario que comprende un
20 sistema como los descritos anteriormente.

Se entiende por “producto sanitario” un dispositivo utilizado en sanidad que está regulado por normativas sanitarias, como por ejemplo, implantes quirúrgicos, implantes oftalmológicos, implantes osteoarticulares, parches, apósitos, catéteres, sondas, vendas, bolsas, sistemas de canalización para administración de medicamentos, sistemas de
25 canalización de fluidos biológicos, apósitos, tubos, suturas, o prótesis.

En una realización particular, la invención se refiere a implantes quirúrgicos, implantes oftalmológicos, implantes osteoarticulares, parches, apósitos, catéteres, sondas, vendas, bolsas, sistemas de canalización para administración de medicamentos, sistemas de

canalización de fluidos biológicos, apósitos, tubos, suturas, o prótesis que comprenden el sistema de la invención como se ha descrito anteriormente.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a los sistemas de la invención como se han descrito anteriormente, y al producto sanitario, para su uso como antibacteriano o antimicótico.

Otra realización de la invención se refiere a un procedimiento para destruir microorganismos que comprende exponer a radiación un sistema en contacto con bacterias u hongos, dicho sistema comprende un sustrato injertado con un polímero, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie de dicho sustrato, según se ha descrito anteriormente, o un producto sanitario según lo descrito anteriormente.

En una realización particular, la radiación tiene una longitud de onda de entre 450 nm y 1000 nm, preferiblemente entre 500 y 900nm.

Los siguientes ejemplos deben interpretarse como ilustrativos de la invención y no como limitativos de la misma.

Ejemplo 1. Preparación de injertos de ácido poliacrílico (PAAc) en películas de silicona (SR-g-AAc).

Materiales empleados

La película de goma de silicona (SR) fue suministrada por Goodfellow (Huntingdon, Reino Unido), se cortó en porciones de 2,5 cm x 1 cm y se lavó con etanol durante 3 h tres veces antes de secarla a 50°C a vacío. El ácido acrílico (AAc), el ácido bórico, el citrato sódico dihidratado, el fosfato sódico tribásico dodecahidratado, el ácido tetracloroáurico (III) (HAuCl₄) y el borohidruro sódico (NaBH₄) fueron suministrados por Sigma Aldrich (St Louis, MO, EE.UU.). AAc se destiló a presión reducida antes de su uso. El tolueno, el fosfato potásico monobásico y el hidróxido de sodio fueron de Baker (México). Se utilizó agua destilada en todos los experimentos.

Las películas SR se irradiaron en aire utilizando una fuente de radiación gamma de ⁶⁰Co (Gammabeam 651 PT, Nordion Inc. Canada, instalada en el Instituto de Ciencias Nucleares de UNAM, México) a una velocidad de dosis de 9,9 kGy/h. Después de la

irradiación, las películas se introdujeron en ampollas de vidrio que contenían soluciones de AAc en tolueno (concentraciones en la Tabla 1). A continuación, se eliminó el oxígeno enfriando las ampollas durante 15 minutos por inmersión en nitrógeno líquido y aplicando vacío para eliminar el aire. Este proceso se repitió cuatro veces. Las ampollas se sellaron y se calentaron en diferentes condiciones (Tabla 1) para formar el copolímero de injerto. Después de la reacción, las películas se lavaron en etanol tres veces (reemplazando el medio cada 12 h) y se secaron a vacío. El porcentaje de injerto se calculó como sigue:

$$\text{Injerto (\%)} = \frac{W_g - W_o}{W_o} \cdot 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Donde W_o y W_g representan la masa de las películas antes y después del injerto, respectivamente.

Tabla 1. Condiciones experimentales para injertar ácido acrílico (AAc) en películas de SR por el método de pre-irradiación.

Parámetro evaluado	Dosis (kGy)	AAc en tolueno v/v (%)	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (min)
Dosis	20-100	50	60	180
Temperatura	40	50	50-80	180
Tiempo de reacción	40	50	60	30-180
Concentración de monómeros	40	30-80	60	180

A 50°C o a temperaturas inferiores no fue posible injertar las películas de SR, pero a 60°C el porcentaje de injerto fue significativo. A temperaturas superiores a 60°C el porcentaje de injerto fue extremadamente elevado, superior a 200%, pero se produjo deterioro en el material.

El porcentaje de injerto sobre la película SR depende de la dosis de radiación previamente absorbida. En un rango de dosis de 20 a 60 kGy se obtienen porcentajes de injerto de hasta 100%. Para una dosis fijada de 40 kGy el rango de injerto es de entre 8% y 65%, a unos tiempos de 8 y 180 minutos respectivamente.

Variando la concentración de monómeros de entre 30 a 80% v/v, el porcentaje de injerto varía entre 13 y 120%.

SR, PAAc y películas SR-g-AAc se caracterizaron por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) usando un espectrómetro PerkinElmer Spectrum 100 (PerkinElmer Cetus Instruments, Norwalk, CT). Para las películas injertadas SR-g-AAc se observaron señales características de la película SR y del polímero PAAc, siendo la banda correspondiente al grupo C=O más intensa cuanto mayor es el porcentaje de injerto.

El análisis termogravimétrico (TGA) y el análisis de calorimetría de barrido diferencial (DSC) confirmaron el injerto de PAAc sobre la película SR. El análisis termogravimétrico se llevó a cabo en un equipo TGA Q50 (TA Instruments, New Castle, DE) calentando de 25 a 800°C a 10°C/min en atmósfera de nitrógeno. Los análisis de calorimetría de barrido diferencial (DSC) se registraron usando un calorímetro DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE) entre 25 y 300°C a 10°C/min.

La capacidad de respuesta al pH de los copolímeros injertados se evaluó midiendo el grado de hinchamiento en medio acuoso a pH comprendido entre 2 y 10 durante 8 h. Las películas de copolímero hinchadas se pesaron después de secar su superficie con papel de filtro para eliminar el agua libre. Los porcentajes de hinchamiento se cuantificaron como sigue:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \cdot 100 \quad \text{Eq. 2}$$

En esta ecuación W_d y W_s representan, respectivamente, la masa de la película seca y la película hinchada. La película SR no hincha en agua debido a su naturaleza hidrofóbica.

Se evaluaron materiales con 3 porcentajes diferentes de injerto y se observaron diferentes grados de hinchamiento en cada uno de ellos, siendo el pH crítico de 4,5.

También se evaluaron las propiedades mecánicas, registrando los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de películas SR y SR-g-AAc en un reómetro Rheolyst AR 1000N (TA Instruments, New Castle, DE) equipado con un kit de torsión sólido y un analizador de datos (AR2500). Las películas se analizaron por duplicado a 20 °C en el rango de frecuencia angular de 0,05-50 rad/s con 0,5% de deformación.

Películas SR-g-AAc con un grado de injerto de 14% mantuvieron los parámetros viscoelásticos de SR con valores de G' y G'' de $2.4 \cdot 10^6$ y $1.8 \cdot 10^5$ Pa, respectivamente.

Cuando el grado de injerto era del 38% se obtuvieron valores de G' de $7.6 \cdot 10^6$ Pa y G'' de $3.0 \cdot 10^5$ Pa, mientras que cuando el injerto era de 61% los valores de G' y G'' fueron $17.8 \cdot 10^6$ y $5.9 \cdot 10^5$ Pa, respectivamente.

Ejemplo 2. Inmovilización de nanopartículas de oro en medio básico.

Se prepararon nanopartículas de oro protegidas con citrato (AuNPs) añadiendo citrato de sodio (10 mg/ml, 2,5 ml) a una disolución de HAuCl_4 (0,5 mM, 50 ml) bajo agitación continua a 100°C durante 15 min. Al enfriar, se obtuvieron nanopartículas de oro con un tamaño de unos 10-15 nm de diámetro y con una banda de plasmón centrado en 520 nm.

A continuación, se siguió un método previamente descrito por Jans et al. (H. Jans, K. Jans, L. Lagae, G. Borghs, G. Maes, Q. Huo, Poly(acrylic acid)-stabilized colloidal gold nanoparticles: synthesis and properties, *Nanotechnol.* 21 (2010) 455702) para el recubrimiento de AuNPs con PAAc con algunas modificaciones. Las películas SR-g-AAc se cortaron en discos de 8 mm de diámetro y se mantuvieron por separado (3 replicados) durante 3 h a 20 °C en viales con 1 mL de la dispersión de AuNPs (463 μM) y 40 μL de NaOH (0,5 M). Después de 3 h bajo agitación magnética (250 rpm), se añadieron 40 μL de NaOH (0,5 M). Los viales se mantuvieron bajo agitación durante otras 18 h. Después de retirar el medio, las películas se lavaron con agua abundante durante 24 h, reemplazando el agua tres veces. Sin embargo, después de este tiempo de incubación, las nanopartículas de oro no se inmovilizaron en la película SR-g-AAc.

Ejemplo 3. Inmovilización de nanopartículas de oro en un medio reductor.

Se sumergieron películas SR o SR-g-AAc con 14, 38 y 61% de injerto (discos de 8 mm de diámetro) en 2 ml de HAuCl_4 (10 mM) y se mantuvieron durante 24 h bajo agitación magnética (250 rpm) a 20 °C o a 60 °C. Se observó un cambio de color, lo que indicaba el depósito espontáneo de nanopartículas de oro tras pocos minutos tanto a 20°C como a 60°C. Aunque el cambio de color fue más intenso a 20°C (figuras 2a y 2c).

Entonces, se retiró cuidadosamente el medio, se pasaron las películas a nuevos viales y se añadió disolución de NaBH_4 (2 ml, 20 mM, recién preparada en agua fría) a las películas y a la disolución de HAuCl_4 sobrante. Todos los viales se mantuvieron bajo agitación durante otros 15 minutos. Finalmente, las películas se lavaron con agua abundante durante 24 h, reemplazando el agua tres veces. En todos los casos se ensayaron, al menos, cuatro replicados independientes. Se observó un cambio de color a violeta más intenso, lo que indicaba una reducción masiva de oro y un mayor depósito de las nanopartículas sobre las películas. Se agitó vigorosamente y el color no se atenuó, lo que demuestra que las nanopartículas están asociadas a las películas injertadas.

El depósito de las nanopartículas de oro fue mayor cuanto menor era el grado de injerto, y así para un grado de injerto de entre 14% y 38% el color fue más intenso que cuando el grado de injerto era de 61% (figuras 2b y 2d).

5 Por otro lado, tras añadir NaBH_4 al HAuCl_4 sobrante bajo las mismas condiciones que sobre la película, se obtuvieron nanopartículas que fueron analizadas empleando un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Philips CM-12 (FEI Company, Países Bajos). El tamaño de esas nanopartículas fue de entre 10 y 20 nm, lo cual debe de ser similar a las nanopartículas formadas in situ sobre el sustrato injertado.

10 Las películas preparadas se visualizaron con tres aumentos (1000x, 3000x y 10000x) en un equipo EVO-LS 15 (Zeiss, Alemania) acoplado con un accesorio de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX). En algunos casos, para poder realizar este análisis, las muestras se sometieron a ablación por plasma (Plasma Cleaner FISCHIONE Model 1020, Dinamarca) durante 10 minutos para eliminar el injerto y hacer posible una visualización detallada de las nanopartículas de oro depositadas. Y así se confirmó la
15 presencia de nanopartículas de oro en la superficie de las películas, siendo más abundantes cuando el proceso se llevó a cabo a 20°C.

Las películas SR y SR-g-AAc 14% y 38% de injerto mostraron una elevada estabilidad física y resistencia al tratamiento con autoclave y ultrasonidos con una liberación menor de nanopartículas de oro. Los discos no perdieron el color violeta tras estos tratamientos.

20

Ejemplo 4. Respuesta fototérmica.

La capacidad de respuesta fototérmica de las AuNPs preformadas se evaluó usando un láser de 514 nm (Changchun New Industries Optoelectronics Technology, China) irradiando dispersiones acuosas de AuNPs (2 ml, 9,26 a 463 μM) a temperatura ambiente
25 con un spot de 0,37 cm^2 a una densidad de potencia de 0,5 W/cm^2 durante 20 minutos. Las dispersiones de AuNPs se mantuvieron a una distancia de 5,5 cm del láser bajo agitación magnética.

Películas SR y SR-g-AAc 14% y 38% de injerto (discos de 8 mm de diámetro) sin modificación adicional y después de la inmovilización de oro (obtenidas según el ejemplo
30 3) se irradiaron a temperatura ambiente con un láser de 514 nm (Changchun New Industries Optoelectronics Technology, China) con un tamaño de spot de 0,37 cm^2 a una densidad de potencia de 0,5 W/cm^2 durante 20 min. Las muestras se mantuvieron a una

distancia de 5,5 cm del láser. El aumento de temperatura se registró con un termopar de tipo K y un multímetro (Keithley 2000, USA). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Las nanopartículas de oro en solución experimentaron un incremento de temperatura que es dependiente de la concentración de las nanopartículas en dispersión acuosa. Así, las concentraciones más elevadas experimentaron un incremento de temperatura de 1,3°C después de irradiar 5 minutos, y de 2,5°C después de 20 minutos de irradiación (figura 3a). En el caso de las películas SR-g-AAc el incremento de temperatura fue mayor debido a la mayor densidad de nanopartículas de oro. Después de 5 minutos de irradiación la temperatura se incrementó entre 6 y 7°C cuando se emplearon películas de SR-g-AAc con un 14% y un 38% de injerto e inmovilizando nanopartículas de oro (figura 3b). Cuando las nanopartículas de oro se formaron sobre películas de SR sin injerto el incremento de temperatura se limitó a 3,5-4°C.

15 **Ejemplo 5.** Actividad antimicrobiana

Discos (8 mm de diámetro) de películas SR y SR-g-AAc 14% y 38% de injerto sin modificación adicional y con AuNPs inmovilizadas, preparadas según el ejemplo 3 a 20 °C, se sumergieron por separado en 2 mL de medio de cultivo de soja tripticasa (TSC) inoculado con 3.6×10^9 UFC/ ml de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y se incubaron durante 2 h a 37°C. Se ensayaron cuatro discos de cada material. Después de la incubación, los discos se lavaron con agua y dos de ellos se irradiaron durante 5 min con un láser de 514 nm a una densidad de potencia de 0,5 W/cm². Luego, tanto los discos irradiados como los no irradiados se colocaron en un vial que contenía 2 mL de PBS (pH 7,4) y se sonicaron durante 1 min. Se prepararon diluciones de cada medio y se llevaron a placas de agar de soja tripticasa (TSA). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y se contaron las colonias.

Se comprobó que la presencia de nanopartículas de oro inmovilizadas en las películas no evitó la adhesión y proliferación. Sin embargo, la irradiación de las películas condujo a una significativa reducción de bacterias (figura 4). No se observó ningún efecto de las películas SR que no tenían nanopartículas de oro. Estos resultados confirman la muerte de bacterias inducida por fototermia debido a una conversión rápida de luz en energía

térmica. La película con mayor eficacia fue la injertada al 14% probablemente por una densidad de partículas de oro más elevada.

Ejemplo 6. Autoclave

- 5 Las películas SR y SR-g-AAc 14% y 38% injerto con oro inmovilizado y previamente utilizados para los ensayos antimicrobianos se sometieron a un ciclo de esterilización por calor húmedo en autoclave (121 °C, 30 min, Trade Raypa AES-12, España) por separado en viales que contenían 2 mL de agua. Después de autoclavar la absorbancia del medio se registró usando un espectrofotómetro UV-vis (Agilent 8453, Alemania).
- 10 Los espectros de resonancia de plasmón se registraron usando un espectrofotómetro UV-vis (Agilent 8453, Alemania).

Las nanopartículas de oro preparadas en el ejemplo 2 y las nanopartículas liberadas del sustrato mostraron un perfil de plasmon similar (figura 5).

Reivindicaciones

1. Sistema para colocación, inserción o implante en seres vivos que comprende un sustrato injertado con un polímero, y nanopartículas de oro en la superficie de dicho sustrato.
- 5 2. Sistema según la reivindicación 1 donde el sustrato se selecciona de entre goma de silicona, poliuretano, polipropileno, polietileno, polietilentereftalato, cloruro de polivinilo, nylon, acetato de celulosa, ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), y poliuretano.
- 10 3. Sistema según la reivindicación 1, donde el polímero se selecciona de entre ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido cítrico reticulado, carboximetil celulosa, dextrano sulfato, agar agar, ácido poliláctico, ácido poli(láctico-co-glicólico), polímeros derivados del ácido maleico, ácido poli(4-hidroxibenzoico), ácido poli(3-hidroxibutírico), ácido poli(itacónico), y ácido poli(estirenosulfónico).
- 15 4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las nanopartículas de oro tienen un tamaño medio de entre 500 nm y 1 nm, preferiblemente entre 100 nm y 1 nm, más preferiblemente entre 50 nm y 1 nm, aún más preferiblemente entre 35 nm y 1 nm.
- 20 5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una goma de silicona injertada con un polímero biocompatible, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie, con un tamaño medio de las nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm.
- 25 6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un sustrato injertado con ácido poliacrílico, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie, con un tamaño medio de las nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm.
- 30 7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una goma de silicona injertada con ácido poliacrílico, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie, con un tamaño medio de las nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm.
8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una goma de silicona injertada con ácido poliacrílico con un porcentaje de injerto de entre 8% y 120%, y nanopartículas de oro depositadas en la superficie, con un tamaño medio de las nanopartículas de entre 500 nm y 1 nm.

9. Procedimiento para preparar el sistema descrito en la reivindicación 1, que comprende:
- a) poner en contacto un sustrato injertado con un polímero con ácido cloro aúrico o una sal de oro en medio acuoso,
 - 5 b) opcionalmente añadir un reductor.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde en la etapa a) la mezcla se mantiene entre 15°C y 70°C.
11. Procedimiento según la reivindicación 9, donde entre la etapa a) y la etapa b) se elimina el medio acuoso y se añade agua.
- 10 12. Sistema obtenible mediante el procedimiento descrito según la reivindicación 9.
13. Producto sanitario que comprende un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y 12.
- 15 14. Implantes quirúrgicos, implantes oftalmológicos, implantes osteoarticulares, parches, apósitos, catéteres, sondas, vendas, bolsas, sistemas de canalización para administración de medicamentos, sistemas de canalización de fluidos biológicos, apósitos, tubos, suturas, o prótesis que comprenden el sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y 12.

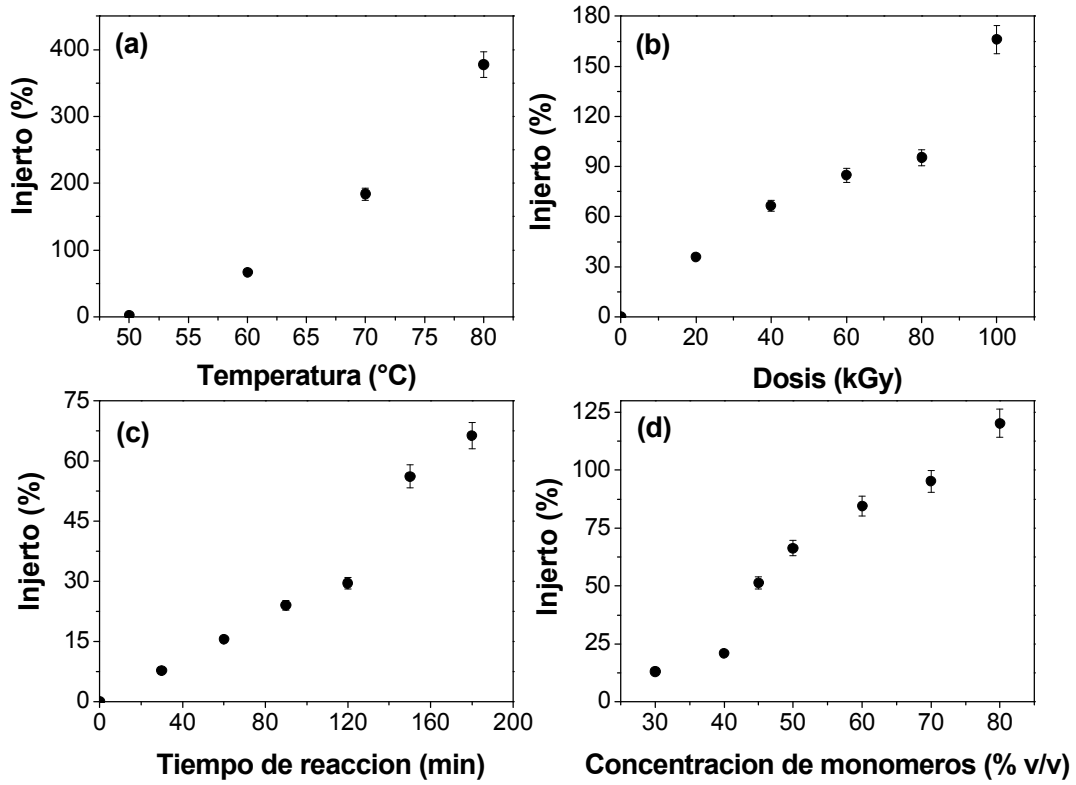


Figura 1

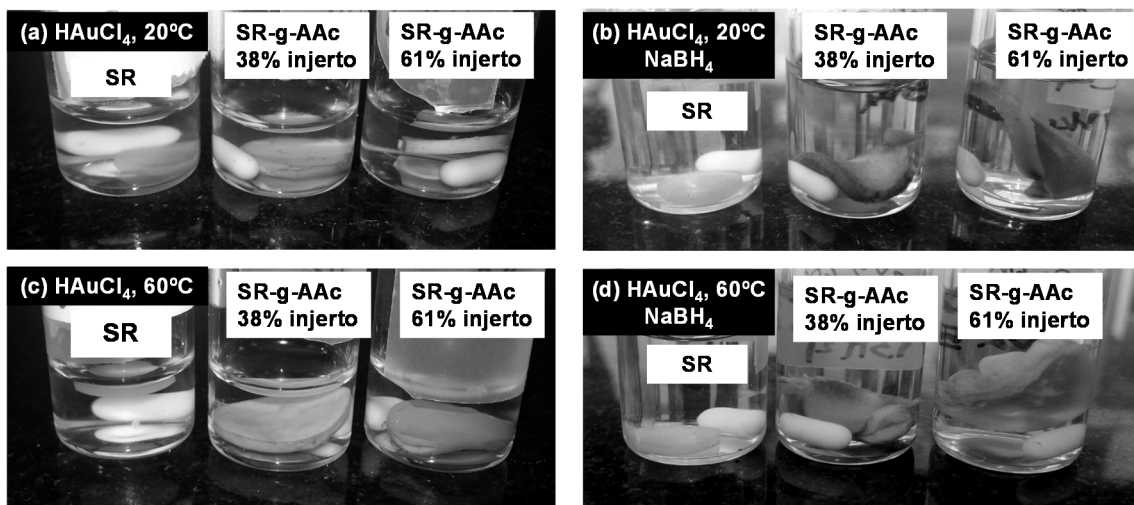


Figura 2

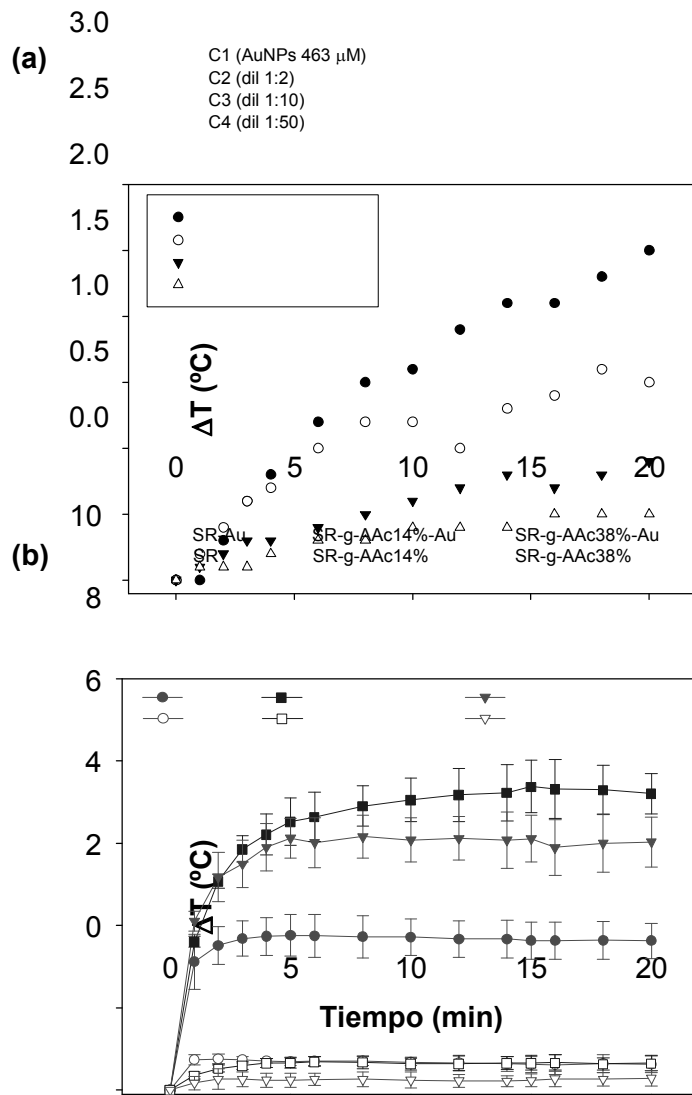


Figura 3

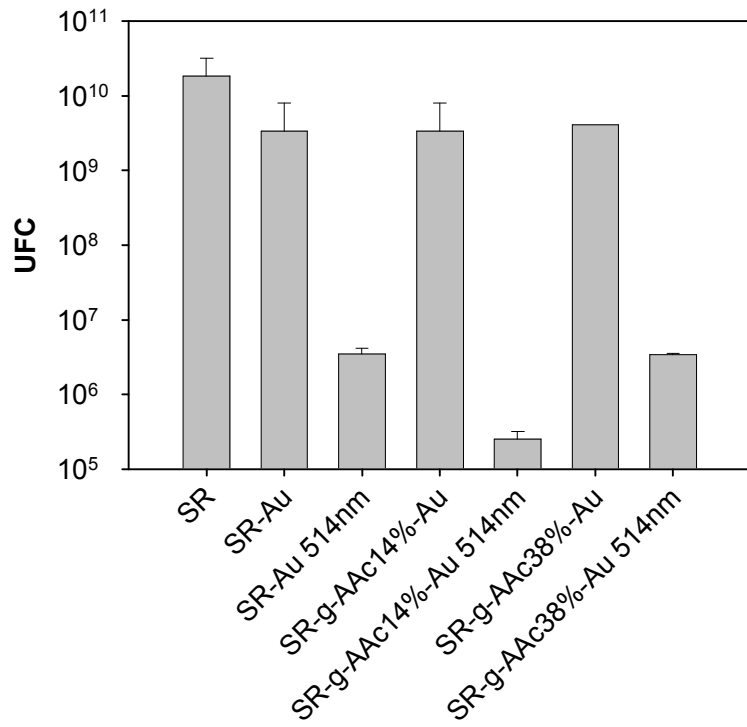


Figura 4

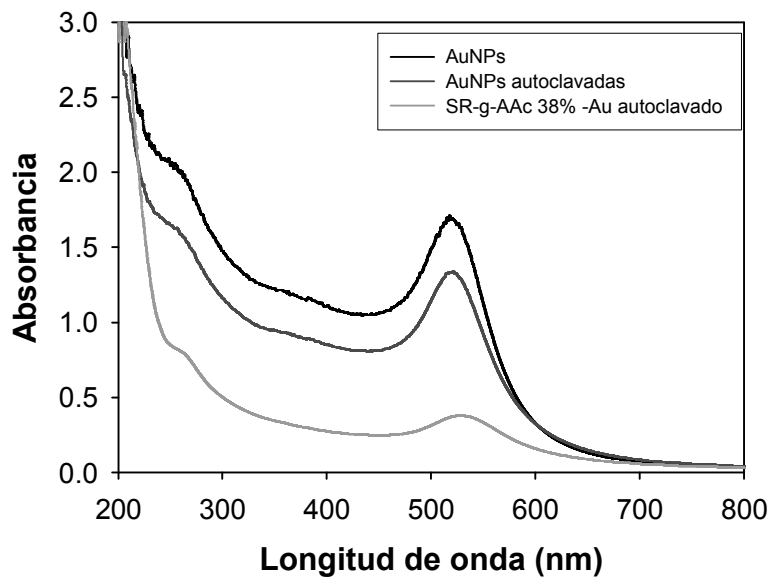


Figura 5



- ②① N.º solicitud: 201730591
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.03.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KHANTAMAT, O et al. Gold nanoshell-decorated silicone surfaces for the near--infrared (NIR) photothermaldestruction of the pathogenic Bacterium <i>E. faecalis</i> . 25/02/2015, Vol. 7, Páginas 3981 - 3993, ISSN 1944-8244 (print) ISSN 1944-8252 (electronic), <DOI: doi:10.1021/am506516r>	1-5, 13, 14
X	CN 102286185 A (UNIV TIANJIN) 21/12/2011, (resumen) [en línea][Recuperado el 28.09.2017]. Recuperado de: EPOQUE EPODOC Database.	1, 4, 9-12
A	US 2016067354 A1 (XU PEISHENG et al.) 10/03/2016, Figura 1, párrafos [0009], [0011], [0034],[0037], [0040], [0041], ejemplo.	1-14
A	BO HU et al. Gold nanorod-covered kanamycin-loaded Hollow SiO ₂ (HKAUROD) nanocapsules for drug delivery And photothermal therapy on bacteria. 30/11/2012, Vol. 5, Páginas 246 - 252, ISSN 2040-3364 (print), <DOI: doi:10.1039/c2nr32457a>	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 02.10.2017</p>	<p>Examinador N. Vera Gutierrez</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K41/00 (2006.01)

A61L27/44 (2006.01)

A61B18/18 (2006.01)

A61L2/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61L, A61B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, NPL, XPESP, XPESP2

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.10.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3, 6-8	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 9-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 6-8	SI
	Reivindicaciones 1-5, 9-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KHANTAMAT, O et al.. Gold nanoshell-decorated silicone surfaces for the near--infrared (NIR) photothermaldestruction of the pathogenic Bacterium <i>E. faecalis</i> . 25/02/2015, Vol. 7, Páginas 3981 - 3993, ISSN 1944-8244 (print) ISSN 1944-8252 (electronic), <DOI: doi:10.1021/am506516r>	25.02.2015
D02	CN 102286185 A (UNIV TIANJIN)	21.12.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un sistema para colocación, inserción o implante en seres vivos que comprende un sustrato injertado con un polímero y nanopartículas de oro en la superficie de dicho sustrato, así como a su procedimiento de preparación y a productos sanitarios que lo contienen.

El documento D01 divulga un catéter de goma de silicona, cuya superficie ha sido modificada con nanopartículas de oro, para su uso en terapia fototérmica. El procedimiento de preparación incluye etapas de funcionalización del sustrato y de las nanopartículas de oro, y posterior reacción química. En el esquema 1 se muestra la preparación de estas superficies modificadas, con los enlaces químicos entre PAMAM y silicona, y entre PAMAM y nanopartículas de oro. Los estudios muestran la eficacia del uso de estos catéteres con superficie modificada, combinado con irradiación NIR, en la destrucción de bacterias patógenas (*E. faecalis*) adheridas a la superficie de silicona.

El documento D02 divulga un material compuesto sensible a la temperatura que comprende nanopartículas de oro (1-20nm) y un polímero de glucano injertado con poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM). El procedimiento de preparación comprende la mezcla de ácido cloroáurico y el polímero de glucano injertado con PNIPAM, junto con un agente reductor (borohidruro potásico) y un agente estabilizante.

A la vista de los documentos citados, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, 9-14 de la invención no es nueva (Artículo 6.1 L.P.).

Respecto a la reivindicación 3, relativa al tipo de polímero injertado en el sustrato, se considera que no implica actividad inventiva (Artículo 8.1 L.P.), dado que se trata de una selección arbitraria de polímeros de diferente naturaleza, que pueden ser injertados en los distintos sustratos recogidos en la reivindicación 1, habiéndose ensayado únicamente el ácido poliacrílico.

A la vista del efecto mostrado en los ejemplos de la solicitud para sistemas como los de la reivindicación 1 en los que el sustrato está injertado con ácido poliacrílico, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 6-8 es nueva e implica actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).