

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 527**

51 Int. Cl.:

A61L 31/10 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
C23C 18/16 (2006.01)
C23C 18/18 (2006.01)
C23C 18/20 (2006.01)
B05D 1/00 (2006.01)
A61L 31/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2015 PCT/EP2015/068650**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16023980**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2015 E 15750729 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3180047**

54 Título: **Proceso de fabricación de un dispositivo médico adaptable y dispositivo obtenido por dicho proceso**

30 Prioridad:

14.08.2014 EP 14382315

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2019

73 Titular/es:

INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE BELLVITGE (IDIBELL) (50.0%)
Hospital Duran i Reynals, 3ª planta Gran Via de l'Hospitalet, 199
08908 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES y
INSTITUT QUÍMIC DE SARRIÀ CETS FUNDACIÓ PRIVADA (50.0%)

72 Inventor/es:

ROSELL GRATACOS, ANTONI;
BORROS GÓMEZ, SALVADOR;
GILABERT PORRES, JOAN;
MARTÍ MARTÍ, SARA;
MONTES WORBOYS, ANA;
RAMOS PÉREZ, VÍCTOR y
MOLINA MOLINA, MARÍA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 707 527 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

Proceso de fabricación de un dispositivo médico adaptable y dispositivo obtenido por dicho proceso

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a dispositivos médicos y, más en particular, a dispositivos médicos adecuados para su uso como *stents* que contienen un recubrimiento antimicrobiano y, opcionalmente, un fármaco adaptado a las necesidades de los pacientes. La invención también se refiere a métodos para la obtención de dispositivos que
10 tengan las características anteriores.

Antecedentes de la invención

Las diferentes afecciones tanto benignas como malignas pueden provocar estenosis traqueobronquial que da lugar a una respiración alterada con disnea y, si no se trata, asfixia y muerte. Los *stents* traqueobronquiales están
15 diseñados para estabilizar mecánicamente la luz una vez normalizado mediante dilatación o citoreducción.

La estenosis traqueal post-inflamatoria es la más común de las lesiones traqueales no malignas y por lo general está provocada por isquemia prolongada y por lo general infección concomitante que provoca necrosis de la pared traqueal. La reparación de la pared dañada puede dar como resultado la formación anormal de tejido de granulación y cicatrización estenótica. Esta situación requiere la restauración de la luz mediante cirugía compleja de la tráquea o dilatación endoscópica con o sin ablación de tejido o inserción de prótesis de tráquea de silicio (*stent*). Actualmente el tratamiento endoscópico tiene una alta tasa de reaparición.

25 La estenosis traqueal maligna puede originarse por tumores primarios del pecho (pulmón, pleuras, esófago) o por metástasis. Pueden utilizarse endoscópicamente diferentes métodos de citoreducción para recuperar la permeabilidad de la luz y, una vez reabierto, se implantan *stents* para evitar la reestenosis. La única propiedad de los *stents* actuales es la compresión mecánica.

30 Una de las complicaciones más comunes de la implantación del *stent* es la colonización bacteriana por microorganismos potencialmente patógenos (MPP), como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*. La colonización bacteriana puede reducir la calidad de vida (es decir, halitosis, tos productiva...); inducir una infección o incluso sepsis que puede provocar la muerte del paciente, si no recibe el tratamiento adecuado.

35 La colonización bacteriana y la formación de biopelículas de los dispositivos médicos implantados son un problema grave que representa más del 80 % de las infecciones microbianas intrahospitalarias. Aunque los antibióticos pueden tratar la gran mayoría de ellos, su uso continuo puede generar resistencia, aumentar el coste y producir efectos adversos en los pacientes. La prevención evitando la formación de biopelículas mediante el recubrimiento de los catéteres y tubos con diferentes antimicrobianos como la plata puede ser más conveniente. La plata tiene una alta toxicidad contra los microorganismos, amplio espectro de acción, resistencia no bacteriana y no es tóxica para
40 las células animales.

Otra complicación es la formación de granulomas en los bordes de los *stents* como consecuencia de la tensión mecánica. Este tejido inflamatorio puede ser una complicación potencialmente mortal si no se trata con glucocorticoides o ablación térmica endoscópica. Por tanto, la entrega de un fármaco antiproliferativo en ambos
45 bordes del *stent* podría reducir o evitar esta complicación (Choong CK et al., *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006, 131 (1): 60-4).

50 La reaparición de la estenosis traqueobronquial después de la retirada del *stent* se observa en casi la mitad de los pacientes (Maldonado F, et al., *Laryngoscope*. 2014, 124 (2): 498-503). Para evitar esto, se han utilizado algunos agentes antiproliferativos tópicos como mitomicina con una buena respuesta aparente, principalmente en niños (Ortiz R, et al., *Eur J Pediatr Surg*. 2014, 24 (1): 39-45). Parece razonable esperar que un tratamiento tópico prolongado con un fármaco antiproliferativo, como el paclitaxel, recubriendo el exterior del *stent* podría reducir el tiempo de implantación e incluso curar completamente la constricción (Zhu GH, et al., *Laryngoscope*. 2011, 121 (10): 2234-9).

55 También se han propuesto fármacos antiproliferativos de recubrimiento, como el cisplatino, para los pacientes que padecen cáncer, después de ensayos satisfactorios en modelos animales (Chao YK, et al., *Chest*. 2013, 144 (1): 193-9). Estos experimentos iniciales abren la posibilidad de recubrir *stents* con tratamientos farmacológicos personalizados de acuerdo con el tipo o estado de mutación del cáncer.

60 La patente US7201935 B1 desvela un método de formación de un recubrimiento sobre un *stent* mediante polimerización en plasma de un ácido carboxílico insaturado, tal como el ácido (met)acrílico. Duque et al., *Biomacromolecules* 2012, 11, 2818-2823 describe un método que comprende las etapas de polimerización en plasma de una película fina de metacrilato de pentafluorofenilo sobre la superficie de un sustrato, lo que permite el posterior recubrimiento de moléculas biológicas.

65 Existe una creciente necesidad de descubrir y diseñar nuevos materiales capaces de interactuar con el tejido

corporal y que presenten superficies adaptables que puedan proporcionarse con diferentes actividades biológicas.

Sumario de la invención

5 Los autores de la presente invención han desarrollado superficies antibacterianas de PDMS para la liberación sostenida de iones de plata creando un recubrimiento antibacteriano y evitando superficies adecuadas para la formación de biopelículas, y que tienen una aplicabilidad potencial sobre dispositivos médicos implantables. El PDMS se une con PFM través de la técnica DVQPP y se incuba con amino azúcar (glucosamina). Como consecuencia del alhéido de azúcar, los iones de plata se reducen sobre la superficie para obtener una superficie
10 recubierta con plata. Este recubrimiento de plata propuesto es capaz de adaptarse a una superficie flexible (como silicona médica) manteniendo su adherencia a la superficie polimérica incluso después de retorcer fuertemente el dispositivo polimérico. Al mismo tiempo, el dispositivo puede adaptarse farmacológicamente recubriendo la superficie elegida con el fármaco requerido. De forma más específica, el fármaco puede unirse a la superficie del *stent* en forma encapsulada para obtener una liberación controlada para tratar la cicatrización del tejido o la
15 formación de granulomas, en la ubicación deseada. El método que se describe en la presente invención puede aplicarse para la activación farmacológica de cualquier *stent* que esté destinado a su uso en cualquier órgano o tejido hueco, incluyendo no solamente el tracto respiratorio, sino también el tracto digestivo, el tracto biliar, el tracto urinario o el sistema vascular.

20 Leyendas de las figuras

Figura 1. ToF-SIMS de muestras de PDMS con diferentes recubrimientos. Muestras de PDMS no modificado (PDMS), PDMS recubierto con PFM (PFM), PDMS recubierto con PFM e incubado con glucosamina (Glucosamina),
25 PDMS recubierto con PFM e incubado con agua milliQ (Agua) y PDMS recubierto con PFM, incubado con glucosamina y con deposición de plata (Plata). (A) Espectros de ToF-SIMS de iones positivos (normalizados por $m/z = 28$) y (B) espectros de ToF-SIMS de iones negativos (normalizados por $m/z = 60$).

Figura 2. Liberación de plata de muestras de PDMS en medio TSB y milliQ en condiciones óxicas.

Figura 3. Actividad bacteriana de las muestras no recubiertas (PDMS) y recubiertas (plata). (A) Comparación de la viabilidad celular entre diferentes cepas bacterianas. Los resultados se obtuvieron analizando imágenes anteriores
30 usando el software ImageJ. (B) Viabilidad de diferentes cepas del sobrenadante después de haber sido incubadas con muestras de plata.

Figura 4. Ángulo de contacto con el agua (ACA) de silicona, y silicona modificada con plata, con agua y mucina al 10 % p/v.

Figura 5. Viabilidad celular de diferentes tipos de estirpes celulares con nanopartículas cargadas con paclitaxel. (A) Fibroblastos normales de pulmón humano (IMR-90) incubados con Ctrl (células de control), \square (nanopartículas sin fármaco), nanopartículas con un contenido de paclitaxel del 1 % y el 3 % y PCTXL (paclitaxel puro) a 14 nM. (B) Fibroblastos estenóticos incubados con Ctrl (células de control), \square (nanopartículas sin fármaco), nanopartículas con un contenido de paclitaxel del 1 % y el 3 % y PCTXL (paclitaxel puro) a 14 nM.
35

40 Descripción detallada de la invención

Método para recubrir un sustrato con una capa metálica

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para recubrir un sustrato con un metal, en lo sucesivo en
45 el presente documento primer método de la invención, que comprende las etapas de

- (i) Poner en contacto al menos una primera superficie del sustrato con un monómero reactivo que contiene un grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para la formación de un recubrimiento polimérico que contiene dicho grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato por polimerización del monómero,
50
- (ii) Poner en contacto el sustrato obtenido en la etapa (i) con un hidrato de carbono reductor que comprende un grupo reactivo con dicho grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para la formación de un enlace covalente entre el grupo reactivo del hidrato de carbono y el grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato, obteniéndose de este modo una superficie modificada con hidrato de carbono reductor y
55
- (iii) Poner en contacto la superficie obtenida en la etapa (ii) con una sal de iones metálicos de dicho metal en condiciones adecuadas para la reducción de los iones metálicos por el hidrato de carbono reductor y la deposición de los iones metálicos sobre la superficie, obteniéndose de este modo una superficie recubierta con el ion metálico.
60

El término "recubrimiento", como se usa en el presente documento, se refiere a una capa que se forma o se aplica de forma natural o sintética sobre la superficie del sustrato.

El término "sustrato", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material cuya superficie pueda
65 recubrirse.

En una realización particular, el sustrato es un sustrato polimérico.

La expresión "sustrato polimérico", como se usa en el presente documento, se refiere a un sustrato de un compuesto químico o mezcla de compuestos que consiste en unidades estructurales de repetición creadas solamente a través de un proceso de polimerización con un peso molecular superior a 6.000 que es sólido a temperatura ambiente. Los polímeros que contienen solamente un solo tipo de unidad de repetición se conocen como homopolímeros, mientras que los polímeros que contiene una mezcla de diferentes unidades repetición se conocen como heteropolímeros o copolímeros. En una realización más particular, el sustrato polimérico es un polímero a base de silicona.

La expresión "polímero a base de silicona", como se usa en el presente documento, se refiere a un material polimérico que comprende al menos dos unidades de organosiloxano seleccionadas independientemente entre unidades siloxi ($R_3SiO_{1/2}$), ($R_2SiO_{2/2}$), ($RSiO_{15}$) o (SiO_2) (habitualmente conocidos como unidades siloxi M, D, T y Q, respectivamente), donde R normalmente representa un grupo alquilo saturado que contiene 1-6 átomos de carbono tal como metilo, o un grupo arilo que contiene 6-10 átomos de carbono, tal como fenilo. El polímero puede comprender grupos adicionales que pueden elegirse entre los siguientes grupos: $-COOH$, $-COO$, $-COO^-$, $-OH$, $-NH_2$, $-NH-$, $-NR-$, $-SO_3H$, $-SO_3^-$, $-OCH_2CH_2-$, $-O-CH_2CH_2CH_2-$, $-O-CH_2CH(CH_3)-$, $-NR_3^+$, $-SH$, $-NO_2$, $-I$, $-Cl$, $-Br$, $-CN$, $-PO_4^{3-}$, $-CONH-$, $-CONR-$, $-CONH_2$, $-CSNH-$, $-SO_2-$, $-SO-$, $-SO_2NH-$, $-NHCO-$, $-NHCO_2-$, $-NHCOO-$, $-OCONH-$, $-NHCSO-$ y $-OCSNH-$, R representa un grupo alquilo. Son ejemplos de polímeros a base de silicona que corresponden a la definición especialmente los poldimetilsiloxanos (PDMS).

Preferentemente, la masa molecular promedio, en número, de los polímeros de silicona que contiene una cadena principal de polisiloxano varía de 10.000 a 1.000.000 aproximadamente y aún más preferentemente de 10.000 a 100.000 aproximadamente.

En otra realización particular, el sustrato es un sustrato metálico.

En otra realización particular, el sustrato es un sustrato metálico recubierto con un sustrato polimérico, preferentemente un sustrato polimérico a base de silicona.

En una primera etapa del primer método de la Invención, el sustrato se pone en contacto con un monómero reactivo que contiene un grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para el recubrimiento de la superficie del sustrato con dicha molécula. Esta etapa se conoce como la etapa de deposición de monómero y consiste en la reacción del monómero con la superficie activada y su polimerización para formar un recubrimiento. Como se describe en el presente documento, un monómero que contiene un grupo carboxilo activado se deposita sobre el sustrato polimérico a base de silicona objetivo para formar un recubrimiento.

Los monómeros reactivos que contienen un grupo carboxilo activado para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, monómeros de ácido acrílico y monómeros de ácido metacrílico.

La expresión "monómero reactivo que lleva un grupo ácido carboxílico reactivo" se refiere a moléculas que tienen la estructura general:



en la que R es un grupo susceptible de polimerización catiónica, aniónica o de radicales libres y L es un grupo saliente.

Estas moléculas pueden reticularse a través de los grupos R dando como resultado un polímero caracterizado porque contiene en cada unidad monomérica al menos un grupo ácido carboxilo activado.

Los grupos R adecuados incluyen grupos monovalentes que pueden experimentar polimerización catiónica y/o por radicales libres que comprenden hasta 20 átomos de carbono. Los grupos R preferidos comprenden grupos reactivos por radicales libres, tales como acrilatos, estírilos, vinilos, vinil éteres, alquilacrilatos C_{1-6} , acrilamidas, alquil C_{1-6} -acrilamidas, N-vinil-lactamas, N-vinilamidas, alquénilos C_{2-12} , alquénil C_{2-12} -fenilos, alquénil C_{2-12} -naftilos o alquénil C_{2-6} fenilos, alquilos C_{1-6} o un grupo reactivo catiónico tal como vinil éteres o grupos epóxido y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el grupo R es un metacrilato.

Los grupos L adecuados son estables en condiciones de reacción y protegen el grupo carboxilato y se liberan fácilmente cuando se ponen en contacto con un grupo reactivo (por ejemplo, un grupo amina). Los grupos L adecuados incluyen ésteres de alquilo, ésteres de fenilo, hidroxiparinitroarilos, ésteres de p-nitrofenilo, derivados de N-hidroxilamina y ésteres de tosilato, todos los cuales pueden estar sustituidos o sin sustituir. Los grupos L preferidos incluyen ésteres de t-butilo, ésteres de 2,4,5-triclorofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, derivados de N-hidroxi-oxo-dihidrobenzotriazina, ésteres de 1-hidroxibenzotriazol, ésteres de tosilato y combinaciones de los mismos. Los grupos L preferidos incluyen ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tosilato y ésteres de N-hidroxisuccinimida y mezclas de los mismos. Preferentemente los compuestos reactivos latentes incluyen pentafluorometacrilatos y N-acriloxisuccinimida y mezclas de los mismos y similares.

En una realización preferida, el grupo R es un metacrilato. En otra realización preferida, el grupo L es un pentafluorofenilo. En una realización aún más preferida, el monómero reactivo que contiene un grupo carboxilo activado es metacrilato de pentafluorofenilo (PFM).

- 5 En una realización preferida, el proceso de deposición de monómero se realiza por un proceso de deposición de vapor.

10 Como se usan en el presente documento, las expresiones "proceso de deposición" y "proceso de deposición de vapor" se refieren a un proceso en el que se forma una capa polimérica sobre una o más superficies de un sustrato a partir de una composición o composiciones precursoras vaporizadas que incluyen uno o más monómeros. Los monómeros se vaporizan y se dirigen y/o se ponen en contacto con una o más superficies de un sustrato (por ejemplo, sustrato semiconductor o conjunto de sustratos) colocado en una cámara de deposición. En una realización particular, el sustrato se calienta. Estos compuestos monoméricos forman una capa no volátil, delgada y uniforme sobre la superficie o superficies del sustrato. Como se usa en el presente documento, "un proceso de deposición de vapor" puede ser un proceso de deposición química de vapor (incluyendo los procesos de deposición química de vapor por pulsos) o un proceso de deposición en capa atómica.

En una realización preferida, el proceso de deposición de vapor es una deposición química de vapor.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "deposición química de vapor" o "DQV" se refiere a un proceso de deposición de vapor en el que la capa deseada se deposita sobre el sustrato a partir de compuestos que contienen metal vaporizado (y cualquier gas de reacción utilizado) dentro de una cámara de deposición sin realizar ningún esfuerzo para separar los componentes de la reacción. La DQV es un proceso por el que los átomos o las moléculas se depositan en asociación con una reacción química (por ejemplo, una reacción de reducción, una reacción de oxidación, una reacción de descomposición, etc.) de especies precursoras en fase vapor. Cuando la presión es inferior a la presión atmosférica, los procesos de DQV se denominan en ocasiones procesos de deposición química de vapor a baja presión (DQVBP). Las técnicas de deposición química de vapor potenciada por plasma (DQVPP) son técnicas de deposición química de vapor en las que se emplea plasma de manera que el gas precursor se ioniza al menos parcialmente, con lo que normalmente se requiere una reducción de la temperatura para la reacción química. Los procesos de deposición química de vapor no necesariamente son procesos en línea de visibilidad, lo que permite que se formen recubrimientos sobre sustratos de geometría compleja. La DQVPP puede realizarse de acuerdo con cualquier técnica conocida en el estado de la técnica, tal como los métodos descritos por Duque et al., (*Plasma Process. Polym.* 2010, 7, 915-925), Francesch; E. et al., (*Plasma Process. Polym.* 2005; 2, 605-611), Langer; D. y Tirrell (*Nature* 2004; 428, 487-492) o Duque et al. (*Biomacromolecules* 2010; 11, 2818-2823).

35 El caudal del monómero puede variarse en el método de deposición. En determinadas realizaciones, el caudal del primer monómero es de aproximadamente 10 sccm, aproximadamente 20 sccm, de aproximadamente 30 sccm a aproximadamente 0,01 sccm, de aproximadamente 20 sccm a aproximadamente 0,05 sccm, de aproximadamente 10 sccm a aproximadamente 0,1 sccm, aproximadamente 30 sccm, aproximadamente 28 sccm, aproximadamente 26 sccm, aproximadamente 24 sccm, aproximadamente 22 sccm, aproximadamente 20 sccm, aproximadamente 18 sccm, aproximadamente 16 sccm, aproximadamente 14 sccm, aproximadamente 12 sccm o aproximadamente 10 sccm, aproximadamente 9 sccm, aproximadamente 8 sccm, aproximadamente 7 sccm, aproximadamente 6 sccm, aproximadamente 5 sccm, aproximadamente 4 sccm, aproximadamente 3 sccm, aproximadamente 2 sccm o aproximadamente 1 sccm. En determinadas realizaciones, el caudal del monómero reactivo es de aproximadamente 0,9 sccm, aproximadamente 0,8 sccm, aproximadamente 0,7 sccm, aproximadamente 0,6 sccm, aproximadamente 0,5 sccm, aproximadamente 0,4 sccm, aproximadamente 0,3 sccm, aproximadamente 0,2 sccm, aproximadamente 0,1 sccm, aproximadamente 0,05 sccm o aproximadamente 0,01 sccm.

50 En determinadas realizaciones, la velocidad de deposición de polímero es de aproximadamente 1 micrómetro/minuto, entre aproximadamente 1 micrómetro/minuto y aproximadamente 100 nm/minuto, entre aproximadamente 10 micrómetros/minuto y aproximadamente 100 nm/minuto o entre aproximadamente 100 micrómetros/minuto 10 y aproximadamente 100 nm/minuto.

55 El proceso de recubrimiento puede tener lugar en un intervalo de temperaturas. En algunas realizaciones, la temperatura del sustrato es la temperatura ambiente. En determinadas realizaciones, la temperatura es de aproximadamente -20 °C, aproximadamente -10 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 90 °C, aproximadamente 100 °C, aproximadamente 110 °C.

60 Cuando el proceso de recubrimiento se realiza por DQVPP, la radiofrecuencia se aplica a una potencia de al menos 1 W, al menos 2 W, al menos 3 W, al menos 4 W, al menos 5 W, al menos 6 W, al menos 7 W, al menos 8 W, al menos 9 W, al menos 10 W, al menos 15 W, al menos 15 W, al menos 20 W, al menos 25 W, al menos 30 W, al menos 35 W, al menos 40 W, al menos 45 W, al menos 50 W o al menos 55 W, al menos 60 W, al menos 65 W, al menos 70 W, al menos 75 W, al menos 80 W, al menos 85 W, al menos 90 W, al menos 95 W, al menos 100 W o más.

Como alternativa, el proceso de recubrimiento por DQVPP puede realizarse mediante el uso de otra fuente de excitación en lugar de radiofrecuencia, tal como microondas o corriente directa.

5 El plasma puede funcionar a presiones bajas, subatmosféricas o atmosféricas como se conocen en la técnica. El monómero puede introducirse en el plasma en forma de un vapor o una pulverización atomizada de gotitas líquidas (documento WO03101621 y documento WO03097245, Surface Innovations Limited). El monómero puede introducirse en el aparato de deposición de plasma por pulsos de forma continua o de manera pulsada por medio de, por ejemplo, una válvula de pulsión de gas.

10 El sustrato al que se aplica el recubrimiento preferentemente se encuentra sustancialmente dentro del plasma pulsado durante la deposición del recubrimiento. Sin embargo, el sustrato como alternativa puede estar situado fuera del plasma pulsado, evitando de este modo daños excesivos en el sustrato o crecimiento del recubrimiento.

15 El monómero normalmente se excitará directamente dentro de la descarga de plasma. Sin embargo, pueden usarse métodos "remotos" de deposición de plasma como se conocen en la técnica. En dichos métodos el monómero entra en el aparato de deposición sustancialmente "corriente abajo" del plasma pulsado, reduciendo de este modo los efectos potencialmente nocivos del bombardeo de especies de corta duración y alta energía tales como los iones.

20 El plasma puede comprender el compuesto monomérico solo, en ausencia de otros compuestos o en mezcla con, por ejemplo, un gas inerte. Los plasmas que consisten en compuesto monomérico solo pueden conseguirse como se ilustra más adelante en el presente documento, en primer lugar, por evacuación del recipiente del reactor en la medida de lo posible y después purga del recipiente del reactor con el compuesto orgánico durante un período suficiente para garantizar que el recipiente esté sustancialmente libre de otros gases. La temperatura en la cámara de plasma es suficientemente alta adecuadamente para permitir que entre suficiente monómero en fase gaseosa en la cámara de plasma. Esto dependerá del monómero y convenientemente se empleará la temperatura ambiente. Sin embargo, pueden necesitarse temperaturas elevadas por ejemplo de 25 a 250 grados centígrados en algunos casos.

25 En realizaciones alternativas de la invención, hay presentes materiales adicionales al precursor de recubrimiento polimérico por plasma dentro del aparato de deposición de plasma. Los materiales adicionales pueden introducirse en el aparato de deposición de recubrimiento de forma continua o de manera pulsada por medio de, por ejemplo, una válvula de pulsión de gas.

30 Los materiales adicionales pueden ser inertes y actuar como tampones sin que se incorpore ninguna de sus estructuras atómicas en el polímero de plasma creciente (los ejemplos incluyen los gases nobles). Un tampón de este tipo puede ser necesario para mantener una presión del proceso necesaria. Como alternativa, el tampón inerte puede ser necesario para mantener la descarga de plasma. Por ejemplo, la utilización de plasmas de descarga luminiscente a presión atmosférica (DLPA) con frecuencia requiere grandes cantidades de helio. Este diluyente de helio mantiene el plasma por medio de un mecanismo de ionización de Penning sin incorporarse en el recubrimiento depositado.

35 En otras realizaciones de la invención, los materiales aditivos poseen la capacidad de modificar y/o incorporarse en el material de formación de recubrimiento y/o el recubrimiento de plasma depositado resultante. Los ejemplos adecuados incluyen otros gases reactivos tales como halógenos, oxígeno y amoníaco.

40 En una segunda etapa del primer método de la invención, el método de la invención comprende poner en contacto el sustrato obtenido en la etapa (i) con un hidrato de carbono reductor que comprende un grupo reactivo con el grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para la formación de un enlace covalente entre el grupo reactivo del hidrato de carbono y el grupo carboxilo en las unidades monoméricas del polímero, con la liberación del grupo L, obteniéndose de este modo una superficie modificada con un monosacárido reductor.

45 La expresión "hidrato de carbono", también conocido como "sacárido" o "azúcar", se refiere a una macromolécula de carbono, hidrógeno y oxígeno e incluye monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. El término "monosacárido", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma simple de un azúcar que consiste en una única unidad de sacárido que no puede descomponerse adicionalmente en componentes básicos o restos de sacáridos más pequeños, incluyendo sin limitación furanosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, un monosacárido modificado, ácido siálico y eritrosa, y mezclas de los mismos.

50 La expresión "hidrato de carbono reductor que comprende un grupo reactivo con un grupo carboxilo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier hidrato de carbono que (i) comprenda al menos un grupo reactivo con un grupo carboxilo y (ii) el aldehído o una cetona está en su forma de cadena abierta. Esto permite que el hidrato de carbono pueda actuar como un agente reductor, por ejemplo, en una reacción con una amina. Un hidrato de carbono puede ser un azúcar reductor cuando su carbono anomérico (el carbono unido a dos átomos de oxígeno) está en la forma libre. Los hidratos de carbono pueden estar en forma de cadena, así como en una estructura de anillo y es posible tener un equilibrio entre estas dos formas. Adicionalmente, algunos hidratos de carbono en forma ceto son hidratos de carbono reductores porque pueden convertirse en un aldehído a través de una serie de cambios tautoméricos para migrar el carbonilo al final de la cadena. Esta vía podría llegar a ser accesible durante el

proceso de curado térmico. Los ejemplos de hidratos de carbono reductores incluyen monosacáridos, ya sea aldosa (que contiene un aldehído) o cetosa (que contiene una cetona), incluyendo glucosa, fructosa, gliceraldehído, lactosa, arabinosa y maltosa. En consecuencia, el componente hidrato de carbono reductor de la presente invención puede ser un monosacárido en su forma aldosa o cetosa, incluyendo una triosa, una tetrosa, una pentosa, una hexosa o una heptosa. El Gliceraldehído y la dihidroxiacetona se consideran azúcares aldosa y cetosa respectivamente. Los ejemplos de azúcar aldopentosa incluyen eritrosa y treosa; y los azúcares cetopentosa incluyen ribulosa, arabinosa, xilosa y lixosa; y los azúcares aldohexosa incluyen glucosa (por ejemplo, dextrosa), manosa, galactosa, alosa, altrosa, talosa, gulosa e idosa; y los azúcares cetohexosa incluyen fructosa, psicosa, sorbosa y tagatosa. Los azúcares cetohexosa incluyen sedoheptulosa. En una realización particular, el hidrato de carbono reductor que comprende un grupo reactivo con el grupo carboxilo es un hidrato de carbono no modificado que tiene la fórmula general $C_m(H_2O)_n$ en la que m y n son iguales o diferentes y en la que el grupo reactivo con el grupo carboxilo es uno de los grupos que se encuentra de forma natural en el hidrato de carbono (por ejemplo, los grupos hidroxilo). En otra realización particular, el hidrato de carbono reductor que comprende un grupo reactivo con el grupo carboxilo es un hidrato de carbono modificado en el que el grupo que reacciona con el grupo carboxilo aparece en la modificación. En una realización más preferida, el hidrato de carbono modificado es N-glucosamina, siendo el grupo amina el grupo que reacciona con el grupo carboxilo.

En otra realización particular, el hidrato de carbono reductor es un disacárido reductor. La mayoría de los disacáridos también son azúcares reductores. Otros estereoisómeros o isómeros ópticos naturales o sintéticos de azúcares reductores también pueden ser útiles como el componente de azúcar reductor de la composición acuosa aglutinante; por ejemplo, dextrosa, que es uno de los isómeros ópticos de glucosa. Además, el azúcar reductor puede comprender una forma deshidratada de un mono o disacárido reductor, tales como, hidroximetil furfural a partir de glucosa deshidrogenada. Adicionalmente, pueden usarse varias fuentes de azúcares reductores adecuados, tales como el jarabe de maíz, el jarabe de maíz rico en fructosa y otros equivalentes de fructosa y dextrosa.

El monosacárido reductor también puede estar sustituido, por ejemplo, con hidroxilo, halo, alquilo, alcoxi, carbonilo u otros grupos sustituyentes.

El hidrato de carbono reductor de la invención se modifica con un grupo reactivo con un grupo carboxilo activado.

La expresión "grupo reactivo con un grupo carboxilo activado", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que es capaz de reaccionar con un grupo carboxilo activado para formar un enlace covalente, es decir, es covalentemente reactivo en condiciones de reacción adecuadas y, en general, representa un punto de unión para otra sustancia. Los ejemplos de grupos reactivos incluyen, pero no se limitan a aminas, grupos hidroxilo, tioles, ácidos carboxílicos y ésteres.

El grupo reactivo con un grupo carboxilo activado puede ser uno de los grupos hidroxilo del hidrato de carbono reductor o un grupo que se ha unido al hidrato de carbono mediante reacción química, en cuyo caso el hidrato de carbono reductor será un hidrato de carbono reductor modificado con un grupo reactivo con un grupo carboxilo activado.

En una realización particular, el grupo reactivo es un grupo amino y el enlace covalente entre dicho grupo amino en el hidrato de carbono y el grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato es un enlace amida.

Los monosacáridos reductores modificados con un grupo amino adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, glucosamina, N-acetil glucosamina, manosamina, N-acetil manosamina, galactosamina, N-acetil galactosamina, sus isómeros (por ejemplo, estereoisómeros) y sus sales (por ejemplo, sal de HCl). En una realización particular, la amina del azúcar es glucosamina, o D-glucosamina y N-acetil glucosamina, o N-acetil-D-glucosamina. Adicionalmente, pueden usarse combinaciones de dos o más aminas de azúcar.

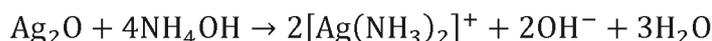
El término "glucosamina", como se usa en el presente documento, se refiere al compuesto β -D-glucosamina.

La etapa de puesta en contacto entre el sustrato obtenido en la etapa (i) de la presente invención y el monosacárido reductor modificado con un grupo amino se realiza durante un tiempo suficiente para permitir la modificación de al menos el 1 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o el 100 % de los grupos carboxilo reactivos en el recubrimiento polimérico de la superficie obtenido en la etapa (i). En consecuencia, la reacción del monosacárido reductor modificado con un grupo amino se realiza durante al menos 1 h, al menos 2 h, al menos 3 h, al menos 4 h, al menos 5 h, al menos 6 h, al menos 7 h, al menos 8 h, al menos 8 h, al menos 10 o más.

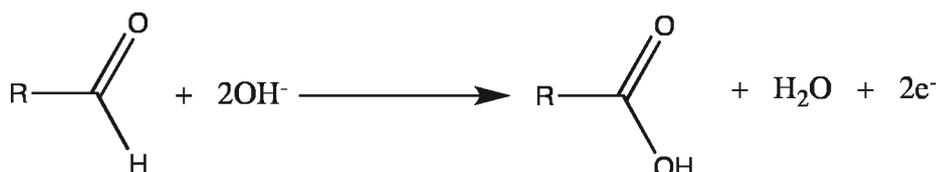
En una tercera etapa del método de la invención, el sustrato obtenido en la etapa (ii) se pone en contacto con una sal de iones metálicos de dicho metal en condiciones adecuadas para la reducción de los iones metálicos por el hidrato de carbono reductor y la deposición de los iones en forma metálica sobre la superficie, obteniéndose de este modo una superficie recubierta con metal.

En una realización preferida, el metal se selecciona entre el grupo que consiste en plata, titanio, cobalto, níquel, cobre, cinc, circonio, molibdeno, estaño y plomo. En una realización aún más preferida, el metal es plata. En este caso, la reacción entre la sal del ion plata y el monosacárido reductor, que se une al sustrato, se realiza mediante la reacción de Tollens. Esta reacción consiste en la reducción de un complejo que contiene iones de plata y amoníaco en presencia del monosacárido reductor. Esto da como resultado la reducción de iones de diaminoplatina (I) a plata metálica y la oxidación del monosacárido al carboxilato correspondiente.

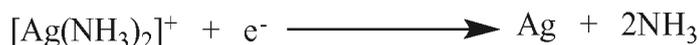
La reacción de Tollens es un proceso de múltiples etapas, que implica la oxidación de un aldehído al ácido carboxílico y la reducción de iones de plata acuosos al metal. En primer lugar, se prepara un complejo de diamina de plata haciendo reaccionar óxido de plata (que se prepara de forma habitual a partir de nitrato de plata e hidróxido de sodio) e hidróxido amónico de acuerdo con la siguiente reacción:



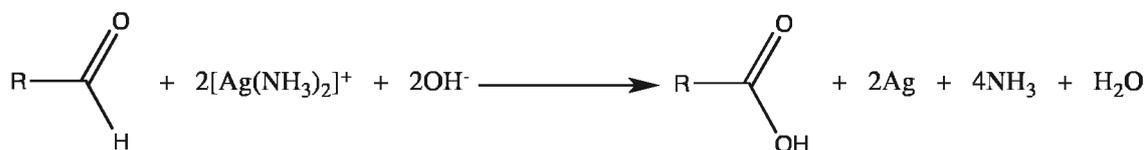
El complejo de diamina es estable, entre 4-24 h, en solución acuosa y puede almacenarse hasta que se necesite. El proceso de deposición de plata se inicia cuando el complejo de diamina se pone en contacto con el monosacárido reductor mediante reacción del monosacárido con iones hidroxilo en la solución alcalina provocando que se oxide a un ácido carboxílico y liberando dos electrones:



Los electrones liberados por la oxidación del aldehído pueden reducir después cada uno un complejo de diamina de plata para proporcionar plata metálica y amoníaco libre:



Esta reacción redox puede resumirse como:



La reacción puede realizarse durante al menos 5 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 40 minutos, durante al menos 50 minutos, durante al menos 60 minutos, durante al menos 2 h, durante al menos 3 h, durante al menos 4 h, durante al menos 5 h, durante al menos 10 h o más.

La tercera etapa del primer método de la invención se realiza hasta que se forma un depósito de densidad o espesor suficiente. En una realización particular, un depósito de densidad o espesor suficiente es un depósito que es capaz de liberar una cantidad apropiada del ion metálico. La cantidad liberada del ion metálico puede cuantificarse mediante cualquier método adecuado conocido por el experto. Por ejemplo, si el ion metálico es un ion de plata, los iones de plata liberados pueden cuantificarse con una solución de ácido nítrico al 50 % mediante plasma óptico acoplado inductivamente (PAI). Una cantidad apropiada del ion metálico es una cantidad que es suficiente para mostrar actividad antimicrobiana sin ser tóxico para las células, especialmente para las células humanas. En una realización particular, cuando el ion metálico es un ion de plata, dicha cantidad está entre 0,1 ppm y 10 ppm, más en

particular, dicha cantidad esta entre 0,1 ppm y 2 ppm.

El primer método de la invención puede aplicarse a una o más superficies del sustrato, ya sea a las superficies enteras o solamente a una porción de las superficies.

5 Una segunda superficie del sustrato también puede ponerse en contacto con un monómero reactivo que contenga un grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para la formación de un recubrimiento polimérico que contenga dicho grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato formado mediante la polimerización del monómero. Sin embargo, en lugar de hacer reaccionar dicha segunda superficie con un hidrato de carbono reductor
10 que contiene un grupo reactivo, la segunda superficie se pone en contacto con partículas, seleccionadas entre nanopartículas y micropartículas, cuya superficie se modifica con grupos reactivos, en condiciones adecuadas para la formación de n enlaces covalentes entre el grupo reactivo del exterior de la partícula y el grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato, dando como resultado de este modo la modificación de la segunda superficie modificada con partículas y en la que la partícula contiene al menos un compuesto terapéuticamente activo. De esta
15 manera se obtienen sustratos en los que una primera superficie contiene un recubrimiento metálico, preferentemente un recubrimiento de plata, y una segunda superficie contiene un agente activo. Estos sustratos son particularmente útiles para la construcción de *stents* en los que las superficies externa e interna están en contacto con diferentes compartimentos corporales y, en consecuencia, cada superficie requiere agentes activos específicos.

20 Por tanto, en una realización preferida, el método de la invención también se aplica al menos a una segunda superficie del sustrato, en el que dicha segunda superficie se pone en contacto con una partícula modificada con un grupo reactivo con el grupo carboxilo activado, en el que dicha partícula se selecciona entre una nanopartícula y una micropartícula, en el que dicha partícula contiene al menos un compuesto terapéuticamente activo y en el que dicho
25 contacto se realiza en condiciones adecuadas para la formación de un enlace covalente entre el grupo reactivo de la partícula y el grupo carboxilo activado de la superficie del sustrato, dando como resultado de este modo la modificación de la segunda superficie con partículas.

En una realización particular, la puesta en contacto con una partícula puede realizarse en toda la superficie de la segunda superficie del sustrato o, como alternativa, en una sola parte de la segunda superficie. En otra realización
30 particular, pueden modificarse una o más superficies del sustrato con diferentes recubrimientos en diferentes partes de las superficies, por ejemplo, una porción de la superficie del sustrato puede recubrirse con un ion metálico y una porción diferente de la misma superficie del sustrato puede ser recubierta con partículas que comprendan un compuesto terapéuticamente activo; o una porción de una superficie del sustrato puede recubrirse con partículas
35 que comprendan el compuesto terapéuticamente activo y otra porción de la misma superficie puede recubrirse con partículas que comprendan el mismo o diferente compuesto terapéuticamente activo. Cuando diferentes porciones de la misma superficie del sustrato van a recubrirse con diferentes recubrimientos, las porciones que no van a recubrirse con el primer recubrimiento pueden cubrirse con una máscara durante la aplicación del primer recubrimiento. Una vez que la primera porción se recubre con el primer recubrimiento, dicha primera porción puede
40 cubrirse con una máscara y las porciones que van a recubrirse con el segundo recubrimiento pueden estar descubiertas. En una realización particular, el grupo reactivo con el grupo carboxilo activado es un grupo amino y el enlace covalente entre el grupo reactivo en la partícula y el grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato es un grupo amida.

En una realización, el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda
45 superficie es el mismo. En otra realización, el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda superficie son diferentes. En el caso en que los recubrimientos poliméricos son idénticos, ambas superficies del sustrato pueden recubrirse simultáneamente poniéndolas en contacto con los monómeros reactivos. En el caso en que el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la
50 segunda superficie son diferentes, entonces el recubrimiento de la primera superficie tiene que realizarse en condiciones en las que la segunda superficie no sea accesible a los monómeros reactivos que forman la primera capa. El sustrato en el que se recubre una primera superficie después se pone en contacto con los monómeros reactivos adecuados para formar la capa polimérica sobre la segunda superficie en la que la primera superficie recubierta no es accesible a los monómeros reactivos.

55 Como se usa en el presente documento, el término "nanopartículas" se refiere a partículas de entre aproximadamente 1 nm y menos de 1000 nm de diámetro. En determinadas realizaciones de la invención, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 1.000 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 10 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 10 nm a aproximadamente
60 1000 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 1000 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 300 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 300 nm. En determinadas
65 realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 150 nm a aproximadamente 300 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 200 nm a aproximadamente

250 nm. En determinadas realizaciones, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 200 nm. En determinadas realizaciones de la invención, las nanopartículas tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 150 nm.

5 El diámetro medio de las nanopartículas de la presente invención puede determinarse por métodos conocidos en la técnica, preferentemente por dispersión de luz dinámica. En particular, la invención se refiere a nanopartículas que son partículas sólidas con un diámetro de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nm cuando se analizan por dispersión de luz dinámica a un ángulo de dispersión de 90 ° y a una temperatura de 25 °C, usando una muestra apropiadamente diluida con agua filtrada y un instrumento adecuado, tal como los instrumentos Zetasizer™ de Malvern Instruments (Reino Unido) de acuerdo con el método de ensayo convencional de la norma ISO 22412: 2008 (método acumulativo A.1.3.2). Cuando se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, generalmente habrá una distribución de las partículas aproximada a esta media, pero al menos el 50 % en número (por ejemplo, > 60 %, > 70 %, > 80 %, > 90 % o más) de las partículas tendrá un diámetro dentro del intervalo de $x \pm 20$ %.

15 En otra realización particular, la partícula es una micropartícula.

El término "micropartículas", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula que tiene un diámetro entre 1 y 250 μm y que incluye, sin limitación, microesferas y microcápsulas. En una realización preferida, el compuesto es una micropartícula.

20 La composición de las partículas no está particularmente limitada siempre que puedan encapsular con uno o más de los compuestos terapéuticamente activos y, siempre que puedan modificarse para contener grupos amino en la superficie externa de manera de permitir la reacción con los grupos carboxilo activados que forman parte del recubrimiento polimérico aplicado a la segunda superficie.

25 En determinadas realizaciones de la invención, la partícula es una partícula polimérica en la que el polímero se selecciona entre poli-(ácido láctico-co-glicólico), polianhídrido, polisulfonamida, alginato, quitosano, polietilimina, polietilenglicol, polietilenglicol-poliéster (PEG-poliéster), poli-L-lisina, ácido poliglútamico, derivados celulósicos (por ejemplo, etil celulosa) y polímeros a base de ácido acrílico (por ejemplo, hidroxipropil metacrilamida). En determinadas realizaciones, el polímero es polietilenglicol-poliéster (PEG-poliéster).

30 Las partículas pueden obtenerse por cualquier método adecuado conocido por un experto en la materia. En una realización particular, cuando la partícula es una partícula polimérica, puede obtenerse poniendo en contacto el compuesto terapéuticamente activo con el polímero en condiciones adecuadas para formar partículas. En una realización más particular, el compuesto terapéuticamente activo y el polímero pueden mezclarse en un disolvente orgánico hidrosoluble adecuado en concentraciones apropiadas para obtener la relación deseada y la mezcla puede añadirse gota a gota a una solución agitada de forma continua. Las partículas resultantes pueden purificarse adicionalmente por medio de diálisis, filtración o centrifugación (Di Mauro, P.P. y Borrós, S. *Pharmaceutical Research* 2014, (10)).

40 Las partículas se modifican con el fin de presentar un grupo reactivo con el grupo carboxilo activado en el exterior de la superficie de la partícula. Dichos grupos reactivos se han definido anteriormente. En una realización preferida, el grupo reactivo con el grupo carboxilo activado es un grupo amino. Se entenderá que el grupo reactivo, preferentemente el grupo amino, puede unirse directamente con los átomos que forman parte la cubierta de la nanopartícula o puede ponerse en contacto con la nanopartícula por medio de una región enlazadora. Por ejemplo, la región enlazadora puede tener entre 4 y 15 átomos (es decir, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) de longitud.

Pueden encapsularse numerosos agentes biológicamente activos, no necesariamente exclusivamente los enumerados anteriormente, en las nanopartículas utilizadas en el método de acuerdo con la invención.

50 En una realización, el compuesto terapéuticamente activo es un compuesto antiproliferativo. Son agentes antineoplásicos/antiproliferativos/antimitóticos adecuados los antimetabolitos tales como los análogos de purinas (por ejemplo, 6-mercaptopurina o cladribina, que es un análogo nucleosídico clorado de la purina), los análogos de pirimidinas (por ejemplo, citarabina y 5- fluorouracilo) y metotrexato, mostazas nitrogenadas, sulfonatos de alquilo, etilimininas, antibióticos (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina), nitrosoureas, cisplatino, agentes que afectan a la dinámica de los microtúbulos (por ejemplo, vinblastina, vincristina, colchicina, epo D, paclitaxel y epotilona), activadores de caspasas, inhibidores del proteosoma, inhibidores de la angiogénesis (por ejemplo, endostatina, angiostatina y escualamina), rapamicina, cervastatina, flavopiridol y suramina.

60 En una realización, el compuesto terapéuticamente activo es un compuesto antiproliferativo y antimigración tal como la citocalasina.

65 En una realización, el compuesto terapéuticamente activo es un compuesto antiangiogénico. Son agentes antiangiogénicos adecuados los anticuerpos u otro antagonista de un agente angiogénico, por ejemplo, proteínas de fusión que se unen al VEGF A, tal como ZALTRAP, (Aflibercept), anticuerpos contra VEGF-A, tales como Avastin (R) (bevacizumab) o contra el receptor de VEGF-A (por ejemplo, receptor de KDR o receptor de Flt-1), inhibidores anti

- PDGFR, tales como GLEEVEC (R) (mesilato de imatinib), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT @/SU1 1248 (malato de sunitinib), AMG706 o los descritos en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.* 1991, 53: 217-39; Streit y Detmar, *Oncogene* 2003, 22: 3172-3179 (por ejemplo, la
- 5 Tabla 3 que enumera una terapia antiangiogénica en el melanoma maligno); Ferrara y Alitalo, *Nature Medicine* 1999, 5 (12): 1359-1364; Tonini et al., *Oncogene* 2003, 22: 6549-6556 (por ejemplo, la Tabla 2 que enumera factores antiangiogénicos conocidos); y, Sato, *int. J. Clin. Oncol.* 2003, 8: 200-206 (por ejemplo, la Tabla 1 que enumera agentes antiangiogénicos utilizados en ensayos clínicos).
- 10 En una realización, el compuesto terapéuticamente activo es un compuesto antiinflamatorio. Son agentes antiinflamatorios adecuados dexametasona, prednisolona, corticosterona, budesonida, estrógeno, sulfasalazina y mesalamina.
- 15 En una realización, el compuesto terapéuticamente activo es un compuesto antiinflamatorio. Los agentes antiinflamatorios adecuados incluyen aspirina, salicilato de sodio, sulpirina, indometacina, diclofenaco de sodio, loxoprofeno de sodio, ferbinaco, zaltoprofeno, piroxicam, nimesulida, meloxicam, celexicob, tialamida, emorfazona, buprenorfina, bromhidrato de eptazocina, pentazocina, tartrato de butorfanol, clorhidrato de tramadol, ketorolaco, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de morfina, sulfato de morfina, hidromorfona, citrato de fentanilo, fentanilo y mofezolaco.
- 20 En una realización, el compuesto terapéuticamente activo es un compuesto citotóxico. Los compuestos citotóxicos adecuados incluyen metotrexato, ciclofosfamida y talidomida, así como metabolitos, sales, polimorfos, profármacos, análogos y derivados de metotrexato, ciclofosfamida y talidomida. En determinadas realizaciones, son pequeñas moléculas citotóxicas preferidas los metabolitos farmacéuticamente activos de agentes citotóxicos. Por ejemplo, en
- 25 el caso de la ciclofosfamida, los metabolitos preferidos son metabolitos farmacéuticamente activos de ciclofosfamida, incluyendo, pero no limitados a 4-hidroxiciclofosfamida, aldofosfamida, mostaza de fosforamida y combinaciones de los mismos.
- 30 En una realización, el compuesto terapéuticamente activo es un agente activo antitrombótico. Los agentes activos antitrombóticos adecuados incluyen inhibidores de la adhesión plaquetaria, tales como albúmina y óxido de polietileno, inhibidores de la agregación plaquetaria incluyendo cilostazol, aspirina y tienopiridinas (ticlopidina, clopidogrel) e inhibidores de GP IIb/IIIa, tales como abciximab, epitifibatida y tirofiban, moduladores de la vía de la coagulación incluyendo heparinoides, tales como heparina, heparina de bajo peso molecular, sulfato de dextrano y tetradecasulfato de beta-ciclodextrina, e inhibidores de la trombina, tales como hirudina, hirulog, PPACK (D-phe-L-propil-L-arg-clorometilcetona) y argatroban, inhibidores de FXa, tales como antiestatina y TAP (péptido anticoagulante de garrapata), inhibidores de la Vitamina K, tales como warfarina, así como proteína C activada.
- 35 En una realización preferida, las partículas contienen un agente antiproliferativo. En una realización más preferida, el agente antiproliferativo es paclitaxel. Nanopartículas adecuadas capaces de encapsular paclitaxel han sido descritos por Ma P. et al., (*J. Nanomed. Nanotechol.* 2013, 4-2) e incluyen, sin limitación, PLGA (Poli[ácido láctico-co-glicólco]), PCL (Poli[ε-caprolactona]), PLA (poli[L-lactida]), quitosano, gelatina, ácido hialurónico, PBCA (Poli[cianoacrilato de butilo]), albúmina, HPG (poliglicerol hiperramificado) y PEG-PE (PEG-fosfatidiletanolamina).
- 40 En una realización preferida, la reacción se realiza hasta que una cantidad suficiente de paclitaxel se asocia a la superficie. La cantidad de paclitaxel asociada a las partículas que modifican la superficie del sustrato puede cuantificarse por cualquier técnica adecuada conocida por un experto en la materia, por ejemplo, por medio de la cuantificación técnica que se describe en los ejemplos siguientes.
- 45 Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que las partículas que contienen paclitaxel sufren una degradación que da como resultado la liberación controlada de paclitaxel.
- 50 *Método para modificar la superficie de un sustrato con una partícula (no parte de la invención)*
- 55 La primera etapa del primer método también puede usarse para modificar la superficie de un sustrato con una partícula que contiene un compuesto terapéuticamente activo. Una vez que se aplica la primera etapa del primer método de la invención dando como resultado la superficie del sustrato cubierta por monómero reactivo polimerizado, el sustrato puede modificarse adicionalmente mediante una partícula modificada con un grupo reactivo y que contiene un compuesto terapéuticamente activo.
- 60 Por tanto, en un segundo aspecto que no es parte de la invención, se desvela un método para modificar la superficie de un sustrato con una partícula seleccionada entre una nanopartícula y una micropartícula, en lo sucesivo en el presente documento segundo método, que comprende las etapas de
- 65 (i) poner en contacto al menos una primera superficie del sustrato con un monómero reactivo que contiene un grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para la formación de un recubrimiento polimérico que contiene dicho grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato por polimerización del monómero y

- (ii) poner en contacto el sustrato obtenido en la etapa (i) con una partícula modificada con un grupo reactivo con dicho grupo carboxilo activado, en el que dicha partícula se selecciona entre una nanopartícula y una micropartícula, en el que dicha partícula contiene al menos un compuesto terapéuticamente activo, y en el que dicha puesta en contacto se realiza en condiciones adecuadas para la formación de un enlace covalente entre el grupo reactivo en la nanopartícula y el grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato, dando como resultado de este modo la modificación de la segunda superficie con nanopartículas.

Todas las definiciones mencionadas anteriormente con respecto a los términos Incluidos en la primera etapa del primer método de la invención, así como sus realizaciones particulares y preferidas, son plenamente aplicables al segundo método.

Las expresiones "partícula", "nanopartícula", "micropartícula", "compuesto terapéuticamente activo" y "grupo reactivo con el grupo carboxilo activado", así como sus realizaciones particulares y preferidas, se han definido anteriormente en relación al primer método de la invención y son plenamente aplicables al segundo método.

En una realización particular del segundo método, al menos una segunda superficie del sustrato se recubre con un ion metálico mediante el uso del primer método de la invención.

En una realización, el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda superficie son iguales. En otra realización, el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda superficie son diferentes. En el caso en que los recubrimientos poliméricos son idénticos, ambas superficies del sustrato pueden recubrirse simultáneamente poniéndolas en contacto con los monómeros reactivos. En el caso en que el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda superficie son diferentes, entonces el recubrimiento de la primera superficie tiene que realizarse en condiciones en las que la segunda superficie no sea accesible a los monómeros reactivos que forman la primera capa. El sustrato en el que se recubre una primera superficie después se pone en contacto con los monómeros reactivos adecuados para la formación de la capa polimérica sobre la segunda superficie en la que la primera superficie recubierta no es accesible a los monómeros reactivos.

En una realización particular, la puesta en contacto con una partícula puede realizarse sobre toda la superficie de una o más superficies del sustrato o, como alternativa, sobre una sola porción de una o más superficies. En otra realización particular, pueden modificarse una o más superficies del sustrato con diferentes recubrimientos en diferentes partes de las superficies, por ejemplo, una porción de una superficie del sustrato puede recubrirse con un ion metálico y una porción diferente de la misma superficie del sustrato puede recubrirse con partículas que comprenden un compuesto terapéuticamente activo; o una porción de una superficie del sustrato puede recubrirse con partículas que comprende un compuesto terapéuticamente activo y otra porción de la misma superficie puede recubrirse con partículas que comprenden el mismo o diferente compuesto terapéuticamente activo.

Sustratos recubiertos de la invención

En otro aspecto, la invención se refiere a un sustrato, en lo sucesivo en el presente documento primer sustrato de la invención, que puede obtenerse mediante el primer método de la invención.

En una realización, el sustrato contiene un sustrato polimérico a base de silicona, más en particular polidimetilsiloxano. En otra realización, el sustrato se ha obtenido usando un metacrilato activado como monómero reactivo que contiene un grupo reactivo. En otra realización más, el grupo activador utilizado en el metacrilato activado es un grupo pentafluorometilo. En otra realización, el sustrato se recubre mediante un recubrimiento polimérico producido por deposición química de vapor, preferentemente, deposición química de vapor potenciada por plasma (DQVPP). En otra realización, el metal, que recubre el sustrato es plata. En otra realización, la capa de plata se ha generado mediante la reacción de Tollens usando iones de complejo de diamina-plata (I). En otra realización, el sustrato se ha obtenido usando glucosamina como hidrato de carbono reductor.

En otra realización, la primera superficie del sustrato contiene un recubrimiento metálico generado de acuerdo con el primer método de la invención y una segunda superficie del sustrato, que está recubierta con partículas seleccionadas entre nanopartículas y micropartículas, en la que dichas partículas contienen al menos un compuesto terapéuticamente activo, obtenida haciendo reaccionar el grupo carboxilo reactivo que forma parte del recubrimiento polimérico con partículas que contienen dicho compuesto terapéuticamente activo y que tienen grupos reactivos con dicho grupo carboxilo sobre su superficie. En una realización, el compuesto terapéuticamente activo que forma parte de las partículas unidas a la segunda superficie se selecciona entre el grupo que consiste en un compuesto antiproliferativo, un compuesto antimigración, un compuesto antiangiogénico, un compuesto antiinflamatorio, un compuesto citostático, un compuesto citotóxico, un agente activo antitrombótico o una combinación de dos o más de los anteriores.

En una realización particular, una o más superficies del sustrato se recubren mediante el recubrimiento metálico generado de acuerdo con el primer método de la invención, recubriendo dicho recubrimiento metálico las superficies enteras o solamente una porción de las superficies. En otra realización particular, una o más superficies del sustrato

se cubren con diferentes recubrimientos en diferentes porciones de las superficies, por ejemplo, una porción de una superficie del sustrato se recubre con un ion metálico y una porción diferente de la misma superficie del sustrato se recubre con partículas que comprenden un compuesto terapéuticamente activo.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a un sustrato, preferentemente un polímero a base de silicona, que contiene:
- (i) Un recubrimiento interno de un material polimérico, estando dicho polímero modificado con un monosacárido oxidado conectado a el recubrimiento polimérico formada entre los grupos carboxilo de la capa y los grupos reactivos con dichos grupos carboxilos en el hidrato de carbono y
 - 10 (ii) un recubrimiento externo de un metal producido mediante la reducción de iones de dicho metal.

Se entenderá que la primera capa es el resultado de la polimerización del monómero reactivo que contiene un grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para la polimerización del monómero y la formación de la capa, seguida de la reacción con un hidrato de carbono reductor, preferentemente un monosacárido reductor, que contiene un grupo reactivo con el grupo carboxilo, preferentemente un grupo amino. El grupo reactivo con el grupo carboxilo reacciona con el grupo carboxilo activado, formando un enlace covalente y liberando el grupo protector. En consecuencia, el grupo protector no forma parte del sustrato recubierto final.

20 La segunda capa es el resultado de la deposición del metal provocada por el hidrato de carbono reductor. Esta reacción conduce a la reducción del metal de forma simultánea con la oxidación del hidrato de carbono reductor, que después se convierte en el carboxilato correspondiente. En consecuencia, el hidrato de carbono aparece en el sustrato recubierto no en la forma reducida (como aldosa o cetosa), sino más bien en su forma oxidada.

25 Se entenderá que el *stent* está hecho de cualquier material. En una realización particular, el *stent* está hecho de un material polimérico, preferentemente un material polimérico a base de silicona, que tiene la flexibilidad/rigidez apropiada, resistencia al desgarro y resistencia a la esterilización para su uso en los dispositivos de la invención. En otra realización particular, el *stent* está hecho de un material metálico. En esta realización particular, el material metálico puede cubrirse mediante una capa de un material polimérico, preferentemente material polimérico a base de silicona.

30 En una realización, toda la superficie del sustrato se modifica mediante una capa que comprende un primer recubrimiento polimérico, que está más cerca de la superficie del sustrato, y un segundo recubrimiento metálico, que está más lejos de la superficie del sustrato. En otra realización, una primera superficie del sustrato se modifica mediante una capa polimérica interna y una capa metálica externa y una segunda superficie del sustrato se modifica mediante un recubrimiento polimérico que se acopla a partículas seleccionadas entre nanopartículas y micropartículas que contienen un compuesto terapéuticamente activo encapsulado dentro, estando conectadas dichas partículas a la capa polimérica mediante enlaces covalentes entre grupos carboxilos de la capa polimérica y grupos reactivos con dichos grupos carboxilo sobre la superficie de las partículas. En una realización, el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda superficie son iguales. En otra realización, el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda superficie son diferentes.

45 En una realización preferida, el sustrato es un *stent*. Como se usa en el presente documento, el término *stent* se refiere a un dispositivo médico configurado para su uso dentro de una estructura corporal, tal como dentro de una luz del cuerpo. Se pretende que el término "*stent*" incluya, pero no se limite a, *stents* autoexpandibles, *stents* expandibles con globo, *stents* cubiertos e injertos. En una realización preferida, el *stent* es un *stent* coronario, un *stent* vascular, un *stent* traqueal, un *stent* bronquial, un *stent* uretral, un *stent* esofágico, un *stent* biliar, un *stent* renal, un *stent* para su uso en el intestino delgado, un *stent* para su uso en el intestino grueso, un implante de laringe, una de derivación, un catéter o una ileostomía.

50 En una realización, el *stent* es de forma tubular. En este caso, el sustrato polimérico a base de silicona puede proporcionarse como una lámina, que después se recubre de acuerdo con los métodos de la presente invención y después se conforma con el fin de proporcionarle una forma tubular. Como alternativa, el sustrato polimérico a base de silicona puede conformarse a una forma tubular y después las superficies interna y externa del tubo pueden recubrirse de acuerdo con los métodos de la invención. En el último caso, una solución que contiene el monómero capaz de formar el polímero a base de silicona se moldea sobre un molde con forma de varilla para formar una película delgada alrededor del molde, con el posterior secado de la solución y la retirada del molde para formar el *stent* tubular.

60 En una realización más preferida, el *stent* es un *stent* traqueal, en cuyo caso la superficie interna contiene el recubrimiento metálico. En una realización más preferida, la superficie interna contiene el recubrimiento metálico y el recubrimiento externo contiene las nanopartículas que contienen el compuesto activo terapéutico. En una realización aún más preferida, el recubrimiento interno contiene plata como metal y el recubrimiento externo contiene paclitaxel encapsulado en las nanopartículas. Los métodos de acuerdo con la invención se adaptan para el recubrimiento, por ejemplo, de endoprótesis y, en particular, de *stents*, tales como, por ejemplo, *stents* coronarios, *stents* vasculares,

stents traqueales, *stents* bronquiales, *stents* uretrales, *stents* esofágicos, *stents* biliares, *stents* renales, *stents* para su uso en el intestino delgado y *stents* para su uso en el intestino grueso. Además, pueden recubrirse de acuerdo con la invención cables guía, hélices, catéteres, cánulas, tubos, así como implantes generalmente tubulares o partes de los dispositivos médicos mencionados anteriormente, a condición de que un elemento estructural comparable a un *stent* esté contenido en dichos dispositivos médicos. Por cuanto que se usan dispositivos médicos expandibles, o respectivamente endoprótesis, el recubrimiento se realiza preferentemente durante el estado expandido del dispositivo respectivo.

Los dispositivos médicos recubiertos se usan preferentemente para mantener la permeabilidad de cualquier estructura tubular, por ejemplo, el tracto urinario, el esófago, la tráquea, el tracto biliar, el tracto renal, el duodeno, el píloro, el intestino delgado y el grueso, los vasos sanguíneos en todo el cuerpo incluyendo el cerebro, también para mantener la permeabilidad de aberturas artificiales tales como las utilizadas para el colon o la tráquea.

En otro aspecto, el *stent* se utiliza en la prevención, la reducción o el tratamiento de la estenosis, la reestenosis, la arteriosclerosis, la aterosclerosis, oclusiones de los vasos, constricciones de los vasos, aneurismas y para aberturas artificiales y accesos.

En otro aspecto que no es parte de la invención se desvela un sustrato, en lo sucesivo en el presente documento segundo sustrato, que es obtenible mediante el segundo método.

En una realización, el sustrato contiene un sustrato polimérico a base de silicona, más en particular polidimetilsiloxano. En otra realización, el sustrato se ha obtenido usando un metacrilato activado como monómero reactivo que contiene un grupo carboxilo reactivo. En otra realización más, el grupo activador utilizado en el metacrilato activado es un grupo pentafluorometilo. En otra realización, el sustrato se recubre mediante un recubrimiento polimérico producido mediante deposición química de vapor, preferentemente, deposición química de vapor potenciada por plasma (DQVPP). En otra realización, la partícula es una partícula de polietilenglicol-poliéster. En una realización, el compuesto terapéuticamente activo que forma parte de las partículas unidas a la superficie del sustrato se selecciona entre el grupo que consiste en un compuesto antiproliferativo, un compuesto antimigración, un compuesto antiangiogénico, un compuesto antiinflamatorio, un compuesto citostático, citotóxico, un agente activo antitrombótico o una combinación de dos o más de los anteriores.

En otro aspecto se desvela un sustrato, preferentemente un polímero a base de silicona, que contiene un recubrimiento de un material polimérico, estando acoplado dicho polímero a partículas seleccionadas entre nanopartículas y micropartículas que contienen un compuesto terapéuticamente activo encapsulado dentro, estando dichas partículas conectadas a la capa polimérica mediante enlaces covalentes entre grupos carboxilo en la capa polimérica y grupos reactivo con dichos grupos carboxilo sobre la superficie de las partículas. Se entenderá que el tipo de enlace entre el recubrimiento polimérico y las nanopartículas dependerá de la naturaleza del grupo reactivo con un grupo carboxilo activado que se encuentra en las nanopartículas. En una realización preferida, el grupo reactivo con un grupo carboxilo activado es un grupo amina, que dará como resultado que las nanopartículas y la capa polimérica estén conectadas por un enlace amida.

El material polimérico se ha definido anteriormente en relación con el primer sustrato de la invención.

En una realización, toda la superficie del sustrato se modifica mediante un recubrimiento polimérico que se acopla a partículas que contienen un compuesto terapéuticamente activo encapsulado dentro, estando conectadas dichas partículas a la capa polimérica mediante enlaces covalentes formados entre grupos carboxilo en la capa polimérica y grupos reactivos con dichos grupos carboxilo sobre la superficie de la partícula, preferentemente enlaces amida si los grupos reactivos con dichos grupos carboxilo son grupos amina.

En una realización particular, una o más superficies del sustrato se recubren mediante una capa polimérica que se acopla a partículas que contienen un compuesto terapéuticamente activo, generadas de acuerdo con el segundo método, recubriendo dicho recubrimiento polimérico, acoplado a nanopartículas, las superficies enteras o solamente una porción de las superficies. En otra realización particular, una o más superficies del sustrato se cubren con diferentes recubrimientos en diferentes porciones de las superficies, por ejemplo, una porción de una superficie del sustrato se recubre con un ion metálico y una porción diferente de la misma superficie del sustrato se recubre con partículas que comprenden un compuesto terapéuticamente activo, o una porción de una superficie del sustrato se recubre con partículas que comprenden un compuesto terapéuticamente activo y una porción diferente de la misma superficie del sustrato se recubre con partículas que comprenden el mismo o diferente compuesto terapéuticamente activo.

En una realización, las superficies primera y segunda del sustrato se modifican mediante un recubrimiento polimérico interno y un recubrimiento metálico externo como se han descrito en relación con el primer método de la invención.

En otra realización, las superficies primera y segunda del sustrato se modifican por una capa polimérica que está acoplada a partículas que contienen una cantidad terapéutica activa del compuesto encapsulado dentro, dichas

partículas están conectadas a el recubrimiento polimérico por enlaces covalentes entre grupos carboxilo en el recubrimiento polimérico y grupos reactivos con dichos grupos carboxilo en la superficie de la partícula. En una realización, las partículas que recubren las superficies primera y segunda contienen el mismo compuesto terapéutico activo. En otra realización, las partículas que recubren la primera y segunda superficie contienen los diferentes compuestos terapéuticos activos.

En otra realización, una primera superficie del sustrato se modifica mediante un recubrimiento polimérico que se acopla a partículas que contienen un compuesto terapéuticamente activo encapsulado dentro, estando dichas partículas conectadas a la capa polimérica mediante enlaces covalentes entre grupos carboxilo en la capa polimérica y grupos reactivos con dichos grupos carboxilo sobre la superficie de la partícula, y una segunda superficie del sustrato se modifica mediante un recubrimiento polimérico interno y un recubrimiento metálico externo como se ha descrito en relación con el primer sustrato de la invención. En una realización, el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda superficie son iguales. En otra realización, el recubrimiento polimérico de la primera superficie y el recubrimiento polimérico de la segunda superficie son diferentes.

Cuando el sustrato es un *stent* traqueal, puede ser ventajoso que tenga una porción de la superficie externa del *stent* recubierta por un material polimérico acoplado a partículas que comprendan un compuesto terapéuticamente activo, tal como paclitaxel. En esta particular realización, dicho material polimérico acoplado a partículas puede estar presente solamente en la porción central de la superficie externa (es decir, sin cubrir las regiones distales del *stent*). En otra realización del *stent* traqueal, la superficie interna se recubre con un material polimérico que contiene una capa metálica obtenida de acuerdo con el primer método de la invención y la superficie externa se recubre en la región central mediante un material polimérico acoplado a partículas que comprenden un compuesto terapéuticamente activo, tal como paclitaxel.

En una realización preferida, el sustrato es un *stent*. El término "*stent*" y sus realizaciones particulares y preferidas se han definido en relación con el primer sustrato de la invención.

La invención se describe a continuación por medio de los siguientes ejemplos, que han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitantes del alcance de la protección.

Ejemplos

Materiales

Se compraron argón 5,0 y oxígeno 5,0 de Abelló Linde SA (España). Se compró PFM de Apollo Scientific LTD (Reino Unido). Se compraron clorhidrato de D-(+)-glucosamina, decilamina y nitrato de plata de Sigma Aldrich.

Sustratos

Los sustratos utilizados en este trabajo fueron obleas de Silicio y muestras de polidimetilsiloxano (PDMS). Se usó el kit Sylgard® 184 (Dowcorning, EE.UU.) para fabricar placas de PDMS. El kit (10:1) se extendió mediante un aplicador de pintura para obtener placas de 500 µm de espesor. Estas placas se incubaron durante la noche a 70 °C. Las películas de PDMS se cortaron en formas circulares de 21 y 10 mm. Es importante indicar que debido a la alta hidrofobia y a la carga electrostática del PDMS, las muestras necesitan un cuidadoso tratamiento de lavado. Las placas de PDMS se lavaron con dodecilsulfato de sodio (SDS, Sigma Aldrich) al 5 %, se aclararon con agua milliQ, se lavaron con Hellmanex® (Helma® Analytics, Alemania) solución al 2 %, se volvieron a aclarar con agua milliQ y finalmente con etanol (Scharlab, España). Las obleas de Silicio se lavaron con el mismo protocolo que las placas de PDMS. Después, las muestras se secaron en una corriente de nitrógeno y se almacenaron en placas de Petri de Nunc LabTek™.

Reactores de plasma

Las modificaciones de la superficie realizadas en este trabajo se realizaron usando un reactor de plasma vertical de acero Inoxidable. Este reactor consiste en una cámara de acero inoxidable ((diámetro: 25,5 cm, longitud: 41,6 cm) reactor de placa vertical). El electrodo de tierra es la cámara del reactor y el electrodo de RF (Radio Frecuencia) es una placa de aluminio, que se usa para sujetar las muestras para la polimerización. Adicionalmente, el electrodo de RF está conectado a un generador de pulsos de RF (13,56 MHz) a través de una caja adaptadora. Los gases y los monómeros se suministran a través de un colector convencional con los flujos de gases ajustados con un árbol de válvulas de aguja. La presión del sistema se controla mediante un controlador indicador de vacío (MKS PDR900, EE.UU.) conectado con un transductor de vacío de cátodo frío/Micropirani (MKS 972 DualMag, EE.UU.) ubicado en el centro del reactor. El sistema tiene una trampa fría de nitrógeno y una trampa química llena de carbón activo conectado para evitar que el monómero que no ha reaccionado llegue a la bomba (Trivac D 16BCS/PFPE Leybold, Alemania). La presión base típica para todos los experimentos es de $6 \cdot 10^{-4}$ mbar (0,06 Pa) y el vapor de monómero

(PFM) se introdujo a una presión constante a 0,02-0,04 mbar (2-4 Pa).

Polimerización de Plasma.

- 5 Los sustratos se colocaron en una placa de aluminio en el centro del reactor. Antes de la introducción del sustrato, la cámara se limpió en plasma de O₂/Ar (1:1) de onda continua durante aproximadamente 1 h a una potencia de 150 W. La potencia de la radiofrecuencia continua se fijó en 15 W y la polimerización por plasma pulsado (ciclo de trabajo 10/20) se realizó durante 3-5 min. Después, la descarga de plasma se apagó y el flujo de vapor de PFM se mantuvo constante durante otros 3 min. Después del proceso de polimerización, las muestras (pPFM) se retiraron cuidadosamente de la cámara de reacción y se almacenaron hasta su uso posterior en una atmósfera de argón.

Caracterización de la superficie modificada

- 15 Las superficies modificadas se caracterizaron a través del ángulo de contacto con el agua (DSA100, Krüss; ACA), el Tiempo de Vuelo (ToF-SIMS) y MEB de Ultra Alta Resolución-UHRSEM 30 (NovaNanoSEM 230, FEI) con alto voltaje. Para analizar la modificación de la superficie por ACA y AFM, tanto las muestras de PDMS modificadas como las obleas de Silicio se analizaron directamente después de la polimerización. Los análisis por ToF-SIMS se realizaron usando un TOF-SIMS IV (ION-TOF, Munster, Alemania) operado a una presión de 5x10⁻⁹ mbar (5x10⁻⁷ Pa). Las muestras se bombardearon con una fuente de pulsos de iones de metal líquido Bismuto (Bi³⁺), a una energía de 25 keV. El cañón se hizo funcionar con un ancho de pulsos de 20 ns, una corriente de pulsos de iones de 0,3 pA para una dosificación inferior a 5x10¹¹ iones/cm², muy por debajo del nivel de umbral de 1x10¹³ iones/cm² generalmente aceptado para las condiciones de SIMS estática. Se detectaron iones secundarios con un analizador de tiempo de vuelo reflector, una placa multicanal (PMC) y un convertidor de tiempo digital (CTD). Las mediciones se realizaron con un tiempo de obtención normal de 10 s, a una resolución de tiempo por CTD de tiempo de ciclo de 25 200 ps y 100 us. La neutralización de la carga se consiguió con un cañón de proyección de electrones de poca energía (20 eV). Se obtuvieron espectros de iones secundarios en unas superficies tramadas aleatoriamente de 100 μm x 100 μm dentro de la superficie de la muestra. Se extrajeron iones secundarios con tensiones de 2 kV y se aceleraron posteriormente a 10 keV de energía cinética justo antes de golpear el detector. La obtención del espectro de masas se realizó con el software ION-TOF Ion Ion Spec (versión 4.1).

Deposición de plata

- 35 Con el fin de conseguir el recubrimiento antimicrobiano, la plata se redujo mediante un azúcar reductor usando el método de Tollens. Este método consiste en la formación de complejos de iones de plata con amoníaco y su posterior reducción usando un azúcar reductor en un baño caliente. Mediante el uso de un azúcar inmovilizado, se reducirán los iones de diaminoplatina (I) a plata metálica dando como resultado un recubrimiento de superficie. La solución de glucosamina se preparó mediante la disolución de clorhidrato de glucosamina en agua milliQ a 1 M. Después, el pH se ajustó a 7,4 con hidróxido de sodio concentrado. La reacción entre la glucosamina y la superficie modificada se realizó incubando las muestras modificadas en una solución de glucosamina durante 6 h. El reactivo de Tollens se preparó añadiendo 25 μl de amoníaco al 15 % a 1 ml de nitrato de plata 0,1 M, observando la precipitación del óxido de plata. Después, se añadieron otros 25 μl de amoníaco al 15 % observando la disolución completa del precipitado debido a la formación de complejo de la plata por el amoníaco. Las muestras modificadas con la glucosamina unida se introdujeron en un vial con 4 ml de agua milliQ. Después, se añadió 1 ml del reactivo de Tollens y se calentó en un baño de agua a 90 °C durante el tiempo de reacción deseado, 60 min. La plata se cuantificó usando un ICP-OES (Optima 2100 DV, Perkin Elmer).

Inmovilización de nanopartículas

- 50 La inmovilización de nanopartículas se realizó usando una suspensión de nanopartículas 20 mg/ml. El pH de la suspensión se ajustó a 7,4 con concentrado de hidróxido de sodio. La reacción de inmovilización de nanopartículas se realizó incubando muestras de PDMS modificado con PFM en una suspensión de nanopartículas durante 6 h. Después del proceso de incubación, las muestras se lavaron exhaustivamente con agua milliQ y se secaron con aire comprimido para su uso posterior.

Liberación de plata

- 60 La liberación de iones de Ag de las muestras recubiertas se midió con ICP-OES. Se sumergieron diferentes muestras recubiertas en 5 ml de TSB y en 5 ml de milliQ a 37 °C. Después del tiempo deseado, se extrajeron 4 ml de cada solución para el análisis y se reemplazaron con 4 ml de solución recién preparada. Las soluciones se repusieron y se analizaron cada día para durante un período de 20 días.

Cuantificación de nanopartículas inmovilizadas cargadas con paclitaxel

- 65 Se disolvieron muestras secas de PDMS con nanopartículas inmovilizadas cargadas con paclitaxel en acetonitrilo y la cantidad de fármaco atrapado se detectó usando una Cromatografía de Líquidos de Ultra Alto Rendimiento (UPLC) (Waters ACQUITY UPLC H-Class). Se usó una columna de fase inversa BEH C18 (1,7 μm 2,1 x 50 mm). La

fase móvil consistió en una mezcla (65:35 v/v) de fase móvil A (agua, que contenía ácido acético al 0,1 %) y fase móvil B (metanol, que contenía ácido acético al 0,1 %) y se entregó a un caudal de 0,6 ml/min. Se inyectó una alícuota de 1,0 μ l en el sistema de UPLC y el tiempo total de análisis fue de 3 min. El paclitaxel y el docetaxel como patrón interno (PI) se cuantificaron por detección UV ($\lambda = 227$ nm, detector Waters TUV). Se usó una curva de calibración de la solución de fármaco patrón (paclitaxel) y el P.I. para obtener las soluciones de calibración, que era lineal en el intervalo de 0,1-2,5 μ g/ml de paclitaxel (con 6 μ g/ml de docetaxel) con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0,995$. La inmovilización del fármaco se calculó usando la Ecuación 1.

Ecuación 1. Inmovilización del fármaco

$$\text{Inmovilización del fármaco} \left(\frac{\text{ng}}{\text{mm}^2} \right) = \frac{\text{Masa del fármaco en la muestra}}{\text{Área de la muestra}}$$

Ensayo bacteriano in vitro

Se realizaron cultivos bacterianos en el Hospital de Bellvitge en Barcelona usando una cepa comercial de *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) y cepas clínicas de *P. aeruginosa* (282939) y *Staphylococcus aureus* (329531). Las bacterias se sembraron en medio TSB (Caldo de soja triptico) para obtener 10 ml de 10^8 ufc/ml y se agitaron a 37 °C durante la noche. Después de la incubación, se prepararon 20 ml de suspensión de bacterias a 10^7 y 10^6 ufc/ml mediante dilución. Se colocaron muestras de PDMS (modificado con plata y sin modificar) sobre una placa estéril de 24 pocillos y se añadió 1 ml de cada suspensión bacteriana. La placa con las muestras se incubó a 37 °C sin agitación durante 24 h. Después del tiempo de incubación, el sobrenadante de cada pocillo se aspiró y las muestras se lavaron 7 veces en agua milliQ. Posteriormente, las muestras se colocaron en una placa estéril de 24 pocillos y se añadió una solución Live&Dead® (Invitrogen) (2 ml de NaCl al 0,9 % + 3 μ l de Solución A + 3 μ l de solución B) a cada pocillo. La placa de 24 pocillos se cubrió para evitar la luz y se incubó durante 15 min. Después del tiempo de incubación, las muestras se lavaron con agua milliQ y se observó su fluorescencia en un microscopio confocal; se obtuvieron imágenes de las secciones doblemente marcadas usando un microscopio de barrido de láser sin filtro espectral confocal Leica TCS-SL (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania) equipado con un láser de argón de 488 nm y láseres He/Ne de 543 nm y de 633 nm (Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Barcelona, España) usando un objetivo de inmersión en aceite 63x (apertura numérica 1,4), resolución de la imagen 1024 x 1024 píxeles.

Viabilidad celular

Con el fin de evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas cargadas con fármaco, se cultivaron células de fibroblastos normales de pulmón humano, de 6 semanas de gestación (ATCC, CCL-186) en EMEM (Gibco, Life Technologies) complementado con FBS al 10 %, Penicilina al 5 %/Estreptomina y Anfotericina (2,5 μ g/ml) y se cultivaron células de fibroblastos estenóticos (muestra extraída mediante biopsia quirúrgica) en DMEM (Gibco, Life Technologies) complementado con FBS al 10 %, Penicilina al 5 %/Estreptomina y Anfotericina (2,5 μ g/ml). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 1000 células/pocillo. Después de 24 h, el medio se aspiró y se reemplazó por medio con diversas concentraciones de paclitaxel (10 nM, 14 nM y 20 nM) de fármaco libre y nanopartículas cargadas con fármaco al 1 % y 3 % teórico. Una columna, con células con paclitaxel no encapsulado en el mismo intervalo de concentraciones (10-20 nM), se usó como control positivo; otra columna, con células sin nanopartículas y sin paclitaxel, se usó como control; otra columna, sin células, se usó como blanco. Después de 1, 4, 8 y 12 días, la viabilidad celular se evaluó a través de MTT (Kit de Ensayo de Proliferación Celular Rápida II, JM-K302-500, MBL International Corporation, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con una solución de reactivo MTT y medio completo a 37 °C. La absorción, que representaba la viabilidad celular, se midió a través de un lector de microplacas (Multiskan Ex, Thermo Scientific) a 450 nm. La viabilidad celular se expresó como porcentaje de células viables en comparación con las células control.

Ejemplo 1

ToF-SIMS

En la **Figura 1** pueden observarse fragmentos de masa positiva y negativa de los recubrimientos de pPFM sobre PDMS y sus reacciones posteriores con la glucosamina y, finalmente, la plata reducida a través de la glucosamina. Las muestras de PDMS no modificado muestran el fragmento de masa de silicio, $m/z = 28$ y picos típicos de PDMS adicionales $-SiCH_3^+$, CH_3SiO^- , SiO_2^- , $SiC_3H_9^+$, $CH_3SiO_2^-$ y $Si_2OC_5H_{15}^+$ ($m/z = 43, 59, 60, 73, 75$ y 147). (Dietrich, R., Grobe, J., Meyer, K., Hagenhoff, B. y Benninghoven, A. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1994, 349 (1-3), 221-222; Gardella, J. a. y Hércules, D. M., *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie* 1981, 308 (3), 297-303; Karen, A., Man, N., Shibamori, T. y Takahashi, K., *Applied Surface Science* 2003, 203-204, 541-546). Las muestras modificadas con PFM presentan los típicos fragmentos de baja masa de metacrilato $-C_2H_3^+$ y $C_2H_5^+$ ($m/z = 27$ y 29), **Figura 1A**. Debido a la interferencia de señales de PDMS y señales de PFM en los espectros positivos; en este tipo

de muestras (a base de PDMS) los espectros negativos pueden ser más interesante para dilucidar el anillo fluorado en los espectros de iones negativos, **Figura 1B**. Los espectros de iones negativos muestran los fragmentos fluorados relacionados con el anillo fluorado $-F^-$ y F_2H^- ($m/z = 19$ y 49).

- 5 Puede observarse un solapamiento del pico característico de la glucosamina ($m/z = 72$ y 180) (Kerwin, J. L., Whitney, D. L. y Sheikh, A. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 1999, 29 (7), 599-607; Pastorini, E., et al., *Analytica Chimica Acta* 2011, 695 (1-2), 77-83) con los fragmentos de masa de PDMS cuando se analiza la muestra de glucosamina (PDMS recubierto con PFM e incubado con glucosamina). Por último, las muestras de plata presentan espectros más sencillos con los picos de plata característicos $-Ag^+$ ($m/z = 107$ y 109).

10

Ejemplo 2

Liberación de plata

- 15 Como es bien sabido, la actividad antibacteriana de la plata no se atribuye al elemento metálico, sino al ion plata (Ag^+). Su mecanismo de actividad es en la actualidad una controversia, sin embargo, parece estar relacionado con la capacidad de formación de complejos entre los iones plata y la cisteína, la interacción con el ADN, la ruptura celular o la inhabilitación del transporte de electrones. En este punto, el estudio de la liberación de iones plata se realiza mediante incubación de las muestras recubiertas de plata en TSB y agua milliQ.

20

- La liberación de plata de obleas de silicio y muestras de PDMS se ilustra en la **Figura 2**. Inicialmente, hay una liberación máxima de Ag^+ de aproximadamente 0,6 y 1,1 ppm (de medio TSB y milliQ, respectivamente) entre las primeras 24 h de inmersión. Durante los siguientes 10 días de inmersión, puede observarse una disminución de la concentración y una estabilización posterior de la liberación de iones plata de aproximadamente 0,1 ppm. Este estallido inicial de la plata es muy interesante debido a su papel como concentración extremadamente antibacteriana cuando se realiza la implantación del dispositivo médico. Las altas concentraciones de iones plata en un corto período de tiempo puede ser una tremenda ventaja para potenciar la actividad antibacteriana una vez que se implanta el dispositivo en el cuerpo y para destruir la posible infección previa.

25

30 Ejemplo 3

Cultivos bacterianos

- Con el fin de someter a ensayo la actividad antibacteriana de las muestras modificadas, se incuban muestras de PDMS usando *S. aureus* y *P. aeruginosa* como representantes Grampositivos y Gramnegativos respectivamente. El crecimiento bacteriano puede observarse de manera significativa incluso en las muestras sin modificar, en la cepa PA01, en las estructuras de biopelícula. Sin embargo, en las muestras modificadas, puede observarse el efecto antibacteriano de los iones plata. En la **Figura 3A** puede observarse que todas las muestras modificadas tuvieron una disminución en la viabilidad de las bacterias presentando todas las bacterias muertas. Esta tremenda actividad antibacteriana se relaciona directamente con los iones plata solubilizados en los medios e incluso con la capa de plata por debajo de las bacterias (Stevens, K. N. J., et al., *Biomaterials* 2009, 30 (22), 3682-90) que puede interactuar con la estructura de la biopelícula desde abajo y provocar la muerte bacteriana. Adicionalmente, no puede observarse ninguna adhesión extra de las bacterias sobre la superficie como consecuencia de la alta acción antibacteriana de los iones plata y debido a las superficies hidrófobas provocadas por las nanoestructuras del recubrimiento de plata. Además, después de la incubación con diferentes cepas, los sobrenadantes se recolectaron y se incubaron de nuevo con el fin de observar la actividad de los iones plata. En la **Figura 3B** puede observarse la reducción en la viabilidad de ambas cepas bacterianas, aproximadamente el 15 % y el 45 % para las Gramnegativas y las Grampositivas, respectivamente. Estos resultados son coherentes con la actividad antibacteriana del ion plata donde la actividad antibacteriana está provocada por el ion plata y no por la plata metálica. Además, puede observarse un interesante efecto de resistencia con respecto al tipo de cepas y muestra que las Grampositivas eran más resistentes que la Gramnegativas probablemente debido al efecto barrera de la pared celular.

50

- De hecho, estos resultados muestran una alta actividad antibacteriana para provocar la muerte completa o, al menos, minimizar considerablemente la formación de biopelículas y la colonización bacteriana. Como resultado, estas superficies funcionales pueden ser candidatas excelentes a materiales implantables creados con propiedades antibacterianas.

55

Ejemplo 4

- 60 *Efecto del recubrimiento de plata sobre el ángulo de contacto con el agua (ACA) de la superficie*

- Como puede observarse en la **Figura 4**, las muestras de silicona recubierta con plata muestran un aumento del ACA superior a 100° a diferencia de los 75° de la silicona sin modificar cuando se trata con agua. Además, las muestras recubiertas con plata muestran un comportamiento similar cuando se tratan con mucina, puede observarse un aumento del ACA de aproximadamente 100° . Este aumento en la hidrofobia de las superficies es muy interesante para maximizar el efecto antibacteriano de las muestras recubiertas con plata mediante su actuación como superficie

65

antideposición de suciedad que reduce la adhesión bacteriana.

Ejemplo 5 (no forma parte de la invención)

5 *Nanopartículas*

La **Figura 5** muestra ensayos *in vitro* del efecto antiproliferativo de las nanopartículas cargadas con paclitaxel con diferentes estirpes celulares humanas. Se ha observado que en fibroblastos humanos normales de pulmón (IMR-90), las nanopartículas cargadas con fármaco libre muestran una ligera disminución de la viabilidad celular, pero el efecto es más dramático con nanopartículas cargadas con paclitaxel. Se observa el mismo perfil cuando se tratan fibroblastos estenóticos con nanopartículas. Se concluye que, en ambos casos, las nanopartículas sin fármaco no mostraron ninguna citotoxicidad obvia confirmando la biocompatibilidad del polímero de nanopartículas. Sin embargo, tanto las nanopartículas cargadas con el fármaco (al 1 % y al 3 %), con una cantidad total de fármaco superior a 14 nM, mostraron una disminución en la viabilidad celular (aproximadamente el 80 % para ambos, el 1 % y el 3 % en caso de IMR-90; y el 70 % y el 80 % para el 1 % y el 3 %, respectivamente, en el caso de los fibroblastos estenóticos) en relación con la liberación de paclitaxel en el medio; (10 nM y 20 nM presentan los mismos resultados). Además, durante el tratamiento se ha observado una reducción progresiva de la viabilidad celular provocada por la acumulación de paclitaxel en el medio cuando hay un aumento de la concentración de fármaco a 14 nM. Adicionalmente, comparando el tratamiento con nanopartículas cargadas con fármaco con el paclitaxel puro pueden observarse comportamientos similares, pero puede apreciarse que las nanopartículas cargadas con fármaco mejoran el efecto de citotoxicidad respaldando la disminución de la viabilidad celular provocada por el efecto del paclitaxel en el medio. Por último, puede concluirse que, en ambos casos, IMR-90 y los fibroblastos estenóticos, la viabilidad celular se ve altamente influenciada por el efecto específico de paclitaxel provocando una disminución celular significativa.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para recubrir un sustrato con un metal que comprende las etapas de

- 5 (i) poner en contacto al menos una primera superficie del sustrato con un monómero reactivo que contiene un grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para la formación de un recubrimiento polimérico que contiene dicho grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato por polimerización del monómero,
- 10 (ii) poner en contacto el sustrato obtenido en la etapa (i) con un hidrato de carbono reductor que comprende un grupo reactivo con dicho grupo carboxilo activado en condiciones adecuadas para la formación de un enlace covalente entre el grupo reactivo del hidrato de carbono y el grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato, obteniéndose de este modo una superficie modificada con un hidrato de carbono reductor y
- 15 (iii) poner en contacto el sustrato obtenido en la etapa (ii) con una sal de iones metálicos de dicho metal en condiciones adecuadas para la reducción de los iones metálicos por el hidrato de carbono reductor y la deposición de los iones en forma metálica sobre la superficie, obteniéndose de este modo una superficie recubierta con metal.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el sustrato es un polímero a base de silicona, preferentemente un polidimetilsiloxano.

20 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el que el grupo reactivo con el grupo carboxilo activado es un grupo amino y en el que el enlace covalente entre el grupo amino en el hidrato de carbono y el grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato es un enlace amida.

25 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el monómero reactivo que contiene un grupo carboxilo reactivo es un metacrilato activado y/o en el que el grupo activador es un grupo pentafluorofenilo.

30 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la puesta en contacto en la etapa (i) se realiza usando deposición química de vapor, preferentemente deposición química de vapor potenciada por plasma (DQVPP).

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el ion metálico es un ion de plata.

35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el ion de plata es proporcionado como ion de complejo de diamina-plata (I), preferentemente nitrato de plata y amonio.

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el hidrato de carbono reductor que comprende un grupo reactivo es N-glucosamina.

40 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que la etapa (i) también se aplica a al menos una segunda superficie del sustrato y en el que dicha segunda superficie se pone en contacto con una partícula modificada con un grupo reactivo con el grupo carboxilo activado, en el que dicha partícula se selecciona entre una nanopartícula y una micropartícula, en el que dicha partícula contiene al menos un compuesto terapéuticamente activo y en el que dicha puesta en contacto se realiza en condiciones adecuadas para la formación de un enlace covalente entre el grupo reactivo en la partícula y el grupo carboxilo activado sobre la superficie del sustrato, dando como resultado de este modo la modificación de la segunda superficie modificada con partículas.

45

50 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 en el que el compuesto terapéuticamente activo se selecciona entre el grupo que consiste en un compuesto antiproliferativo, un compuesto antimigración, un compuesto antiangiogénico, un compuesto antiinflamatorio, un compuesto citostático, un compuesto citotóxico, un agente activo antitrombótico y una combinación de uno o más de los anteriores.

11. Un sustrato obtenible mediante un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

55 12. El sustrato de acuerdo con la reivindicación 11, que es un *stent*.

60 13. El *stent* de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la primera superficie se ha recubierto con un recubrimiento metálico y en el que una segunda superficie se ha recubierto con partículas, y en el que la superficie que contiene el recubrimiento metálico es la superficie interna y la superficie que contiene el recubrimiento de partícula es la superficie externa.

65 14. El *stent* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 que es un *stent* coronario, un *stent* vascular, un *stent* traqueal, un *stent* bronquial, un *stent* uretral, un *stent* esofágico, un *stent* biliar, un *stent* renal, un *stent* para su uso en el intestino delgado, un *stent* para su uso en el intestino grueso, un implante laríngeo, una derivación, un catéter o una ileostomía.

15. El *stent* de acuerdo con la reivindicación 14 para su uso en la prevención, la reducción o el tratamiento de la estenosis, la reestenosis, la arterioesclerosis, la aterosclerosis, las oclusiones de vasos, las constricciones de vasos, los aneurismas y para las aberturas y accesos artificiales.

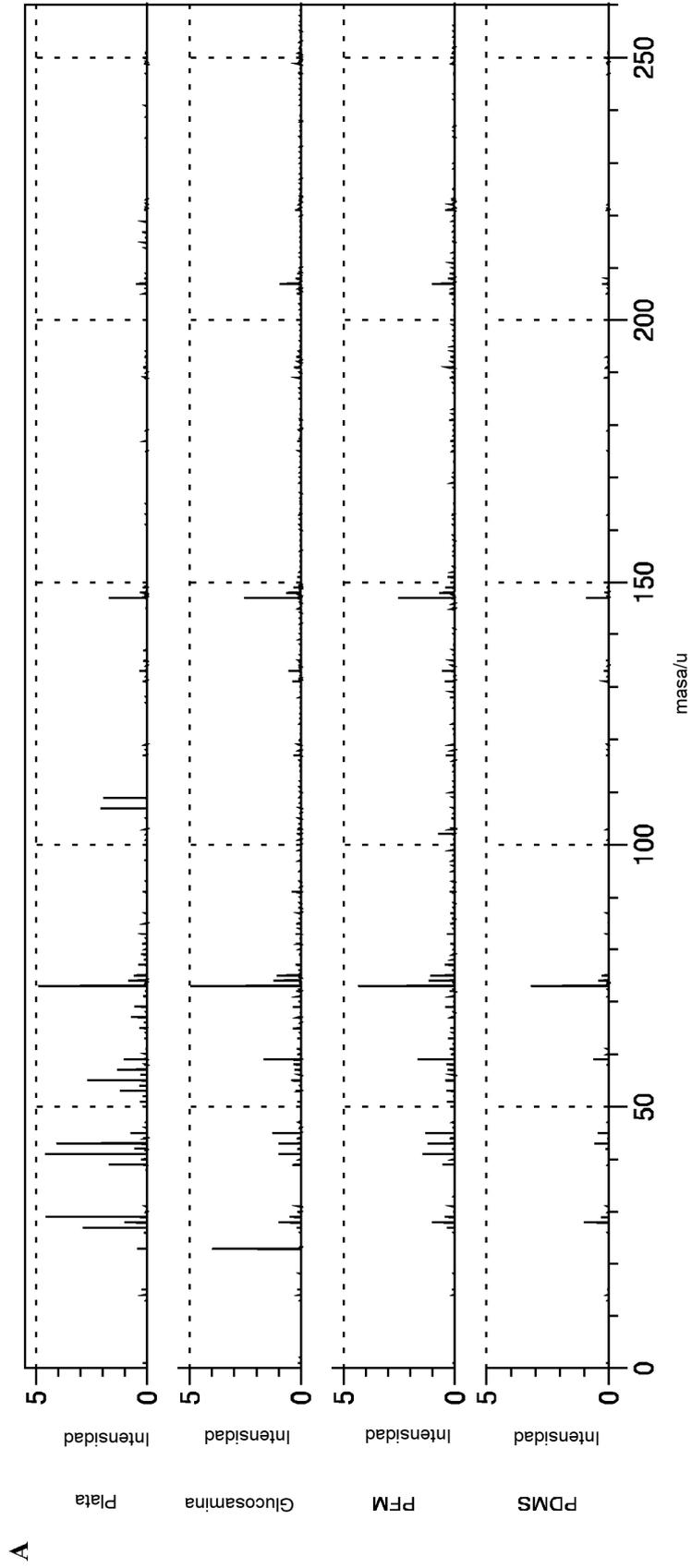


Fig. 1

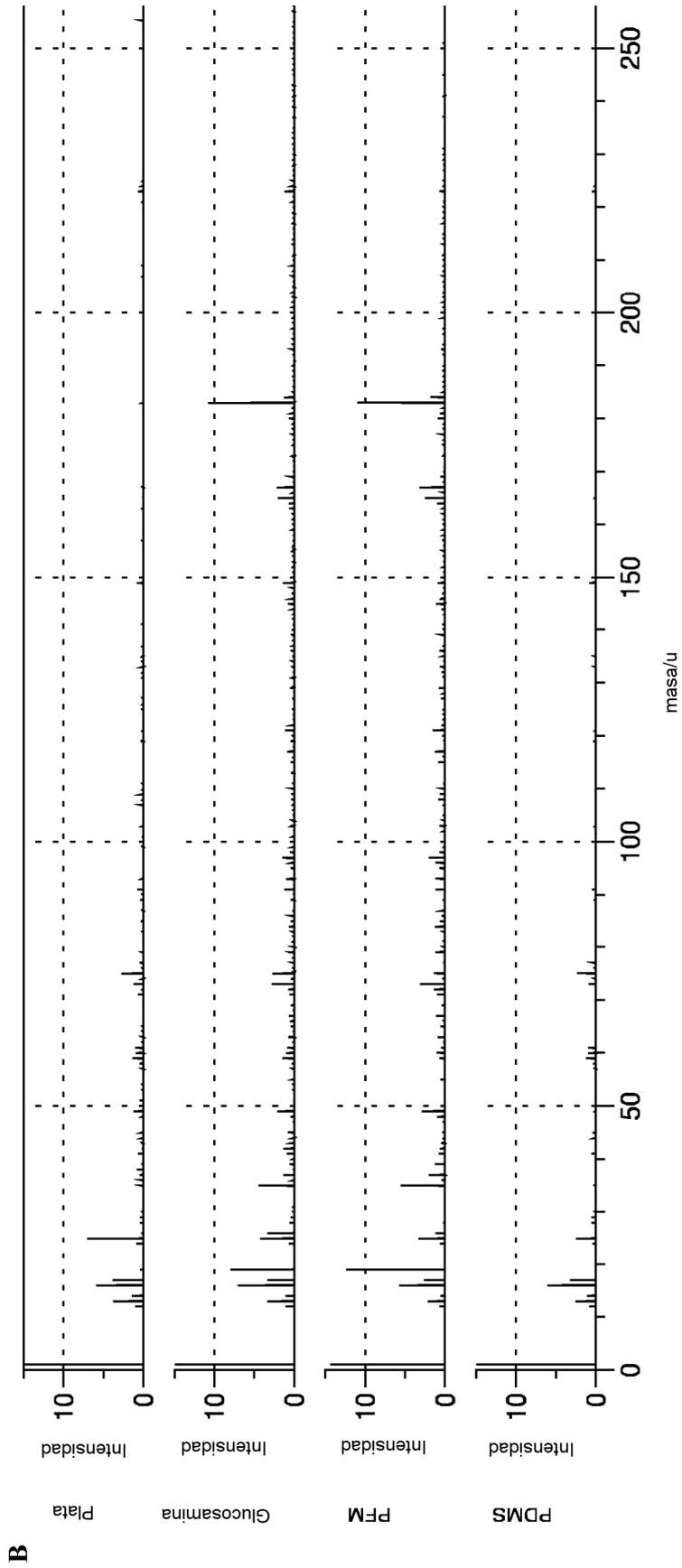


Fig. 1 (CONT.)

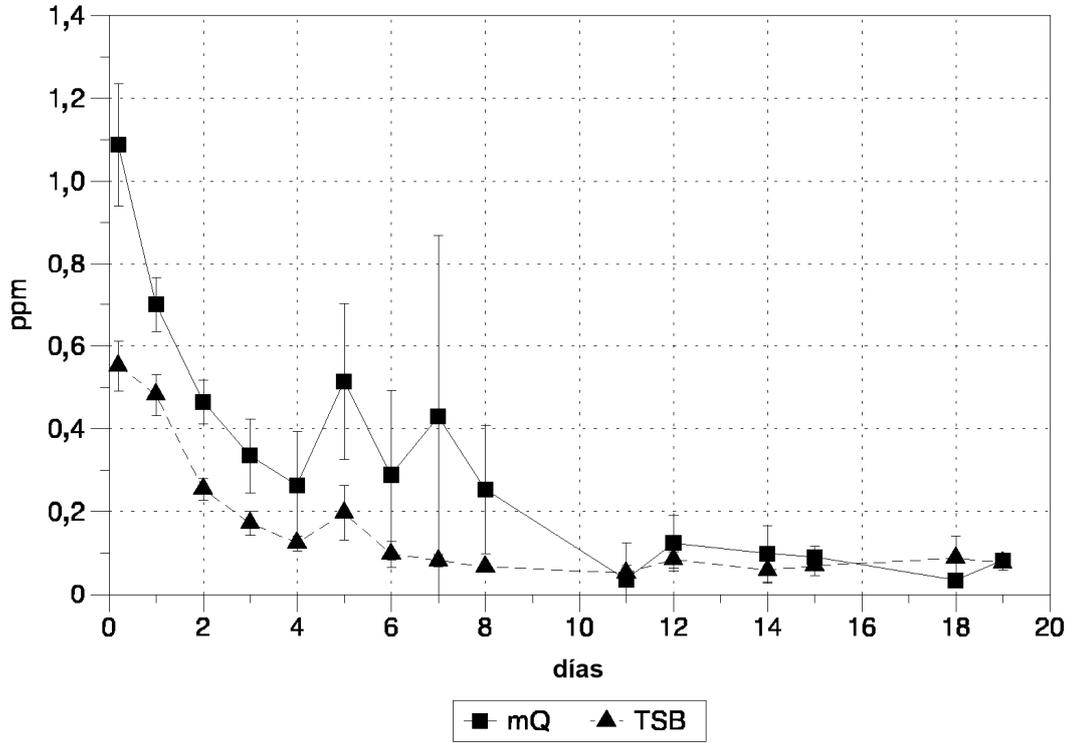


Fig. 2

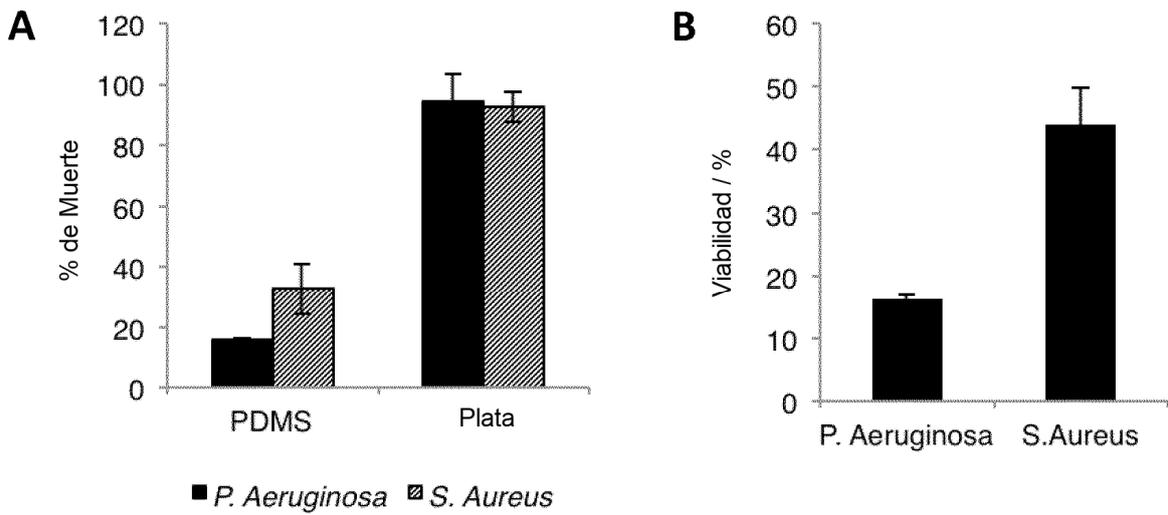


Fig. 3

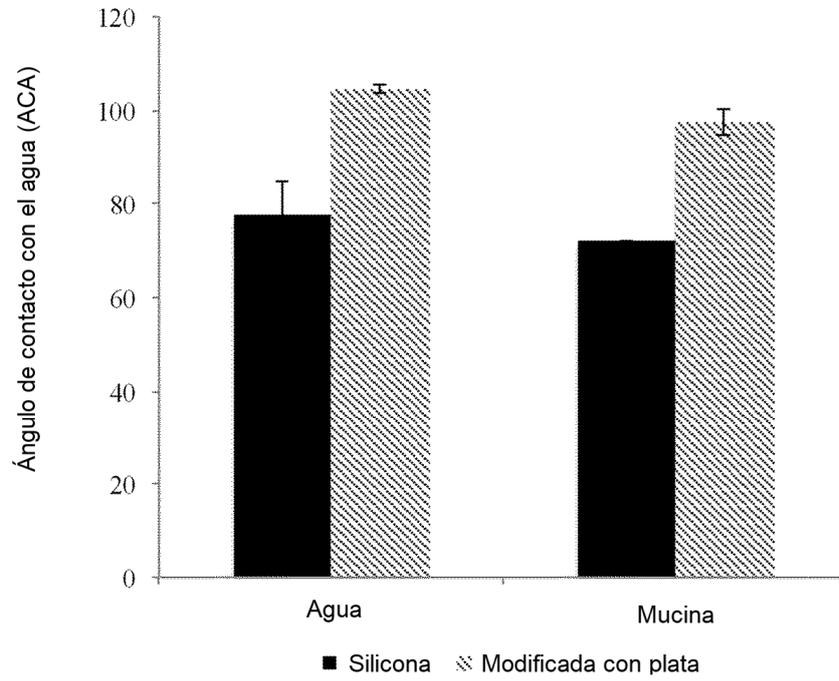
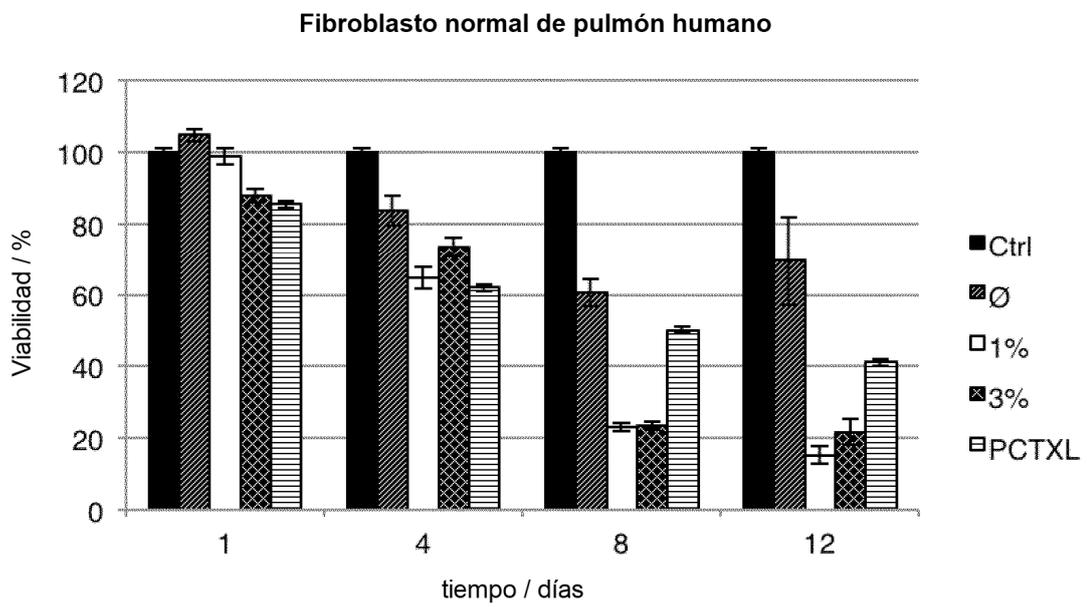


Fig. 4

A



B

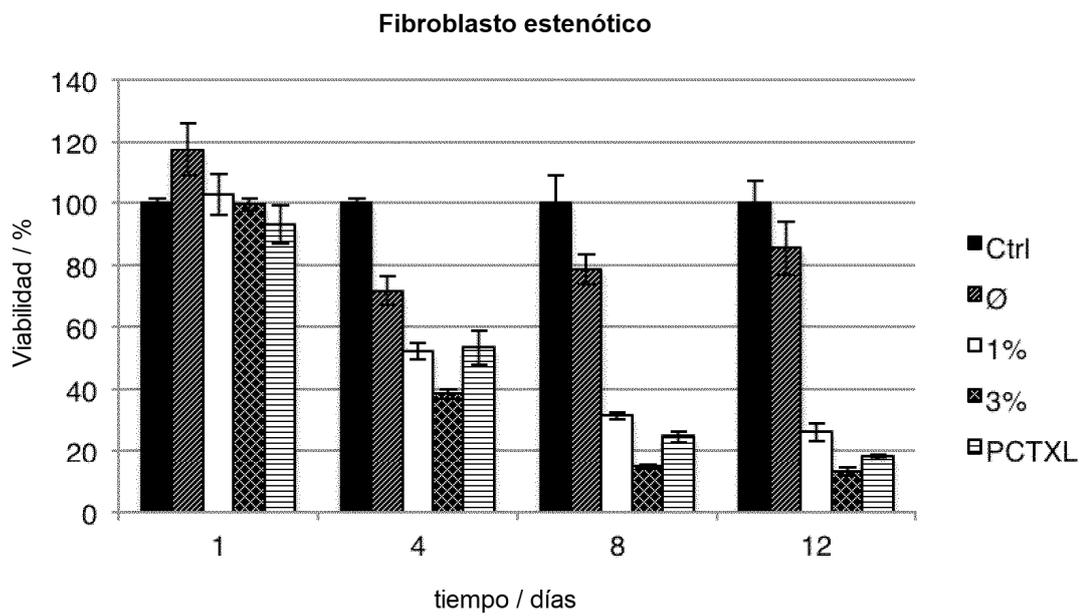


Fig. 5