

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 261**

21 Número de solicitud: 201100999

51 Int. Cl.:

A61F 2/02 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

A61L 27/04 (2006.01)

A61L 27/30 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

13.09.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.03.2013

Fecha de la concesión:

08.10.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.10.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE VIGO (100.0%)
CAMPUS UNIVERSITARIO S/N
36310 VIGO (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

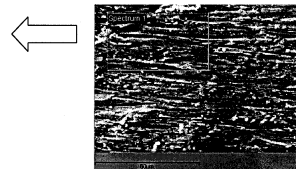
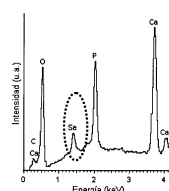
**GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, Pío Manuel;
SERRA RODRÍGUEZ, Julia;
COCHÓN CORES, Bárbara;
PEREIRO PEREIRO, Iago;
RODRÍGUEZ VALENCIA, Cosme;
LÓPEZ ÁLVAREZ, Miriam y
CHIUSSI, Stefano**

54 Título: **RECUBRIMIENTO SINTÉTICO DE IMPLANTE ÓSEO.**

57 Resumen:

La invención describe la incorporación de selenio en recubrimientos de hidroxiapatita para implantes óseos. El selenio confiere a la estructura una mayor semejanza al tejido óseo y mayor funcionalidad bioquímica respecto a los implantes de la técnica basados en fosfatos de calcio con otros elementos minoritarios. Consigue una mejora en la osteointegración inhibiendo la proliferación de osteoclastos y promoviendo la de osteoblastos sanos, y presenta además propiedades antibacterianas y anticancerígenas.

Figura 1



ES 2 399 261 B1

DESCRIPCIÓN

RECUBRIMIENTO SINTÉTICO DE IMPLANTE ÓSEO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención describe un recubrimiento para implantes óseos que incluye selenio. Tiene aplicación en el campo de la medicina, en concreto de la cirugía e
5 implantación de prótesis clínicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El selenio es un mineral traza y nutriente esencial que previene la degeneración de los tejidos. Varias enfermedades como el cáncer, la esclerosis y la distrofia muscular
10 han sido relacionadas con el déficit de este elemento. Sin embargo no es hasta los años 70 cuando se comprueba su influencia directa sobre la salud humana con el descubrimiento en China de las enfermedades de *Keshan* y la de *Kashin-Beck*. La enfermedad de *Keshan* se manifiesta como una cardiopatía que afecta a niños y jóvenes. La enfermedad de *Kashin-Beck* aparece como una condrodistrofia
15 caracterizada por lesiones degenerativas y necróticas de los huesos largos y del cartílago, con la consiguiente osificación irregular, detención del crecimiento y posible enanismo.

Estudios epidemiológicos muestran que la deficiencia de selenio se acompaña por la
20 pérdida de inmunocompetencia, ya que se ha descrito que estimula la producción de linfocitos citotóxicos con la consiguiente destrucción de células tumorales (S. Kapoor "inhibition of osteopontin dependent carcinogenesis" J. Cancer Res. Clin. Oncol. 134, 2008, pp. 927-928). Respecto a sus propiedades como antioxidante, se ha comprobado que personas infectadas con VIH tienen bajos niveles de selenio en
25 sangre y que este elemento puede ser un potencial inhibidor de la replicación del virus en laboratorio (D. Malvy, K. Castetbon "*Micronutriments essentiels et infection par le VIH*" Nutr. Clin. Metabol. 12, 1998, pp 187-97). Cualquier condición asociada con el incremento del estrés oxidativo e inflamación como pancreatitis, asma y artritis reumatoide puede estar influenciada por bajos niveles de este elemento.

30

Existen estudios *in vitro* que demuestran sus propiedades anti-bacterianas. Las infecciones típicas producidas durante la cirugía para la incorporación del implante en

el organismo son provocadas habitualmente por la colonización de dos bacterias: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha demostrado que el selenio puede inhibir la colonización bacteriana mediante la formación de radicales superóxidos (P. L. Tran y colaboradores "*Organoselenium coating on cellulosa inhibit the formation of biofilm by pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus*" 5 *Applied and Environmental Microbiology*, 75 N° 11, 2009, pp 3586-3592).

Otros estudios en co-cultivo demuestran que el selenio es un agente biológicamente activo inhibiendo la proliferación de osteoblastos tumorales y promoviendo la de 10 osteoblastos sanos (P.A. Tran, L. Sarin, R.H. Hurt, T.J. Wester "Differential effect of nanoselenium doping on healthy and cancerous osteoblasts in coculture on Titanium" *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 5, 2010, pp. 351-358). En este sentido, aunque productos comerciales como el Kalsis® basados en selenio son utilizados como estimuladores de tejido óseo (M. Montero et al. "*Kalsis, a food 15 supplement decreases the ovariectomy-induced osteopenia in rats*" *Bone* 44, 2009, pp S339-S450) se diferencian de la presente invención porque consisten en suplementos alimenticios, y proponen un mecanismo de acción que pasa por el torrente circulatorio y llega al entorno de las células con una farmacodinámica muy específica. Estas enseñanzas no sugieren la fabricación de un recubrimiento basado 20 en la incorporación directa del selenio en la estructura cristalina de la HA ni el resultado que ofrece esta estructura, que no resulta predecible.

Respecto a la composición del tejido óseo en su fase mineral, el mineral más importante es el resultante de la agregación de cristales pequeños e irregulares de 25 fosfatos de calcio designada como apatita ósea ó hidroxiapatita (HA). Esos cristales de hidroxiapatita de calcio y fósforo iónicos suponen el 65-70% del peso seco del hueso, que contiene además otros iones como citrato, carbonato, magnesio, sodio y concentraciones traza precisamente de selenio, entre otros. En la actualidad muchos de los implantes metálicos para sustitución ósea son recubiertos con una capa de 30 HA para favorecer una mejor integración del dispositivo en el organismo (S. Zaichick, V. Zaichick " *The effect of age and gender on 38 chemical element contents in human femoral neck investigated by instrumental neutron activation analysis*" *Biol. Trace. Elem. Res.* 137, 2010, pp.1-12).

La solicitud internacional WO 2010114827 A1 describe un sustituto de implante óseo que comprende un agente osteogénico y partículas preferiblemente de zeolita que contienen metales catiónicos capaces de promover la osteogénesis. El agente osteogénico puede ser un agente osteoinductivo o osteoconductor y eso comprende la HA. Sin embargo este planteamiento es muy general en lo que refiere a los metales catiónicos tal como se reivindican; de hecho, sólo hace referencia a zinc, plata y cobre, preferiblemente zinc. Ninguno de estos metales está situado siquiera en el grupo del selenio (VIA) en la tabla periódica. Esta formulación tan general no sugiere la particularidad del selenio como componente estructural del recubrimiento de implantes óseos de la invención ni sugiere sus ventajas, por tanto no debe afectar a la patentabilidad de la invención.

La patente ES 2174603 T3 describe un implante óseo con hidroxiapatita que incorpora elementos de los grupos IIA, IVA y VIIA de la tabla periódica, capaz de promover el crecimiento óseo sobre el implante óseo. Esta referencia no incluye el grupo VIA donde se encuentra el selenio. El procedimiento utilizado para su incorporación es además distinto al utilizado en la presente invención.

La WO 9640170 A2 describe una gran cantidad de compuestos metálicos que consiguen reducir el rechazo del implante en un paciente, útiles también como fármacos inmunosupresores. Estos compuestos no incorporan el selenio en ninguna de sus formas iónicas, y por tanto no anticipan el objeto de la presente invención.

La solicitud US 2009/0093571 A1 describe la formación de un implante óseo con estructura cristalina formado por silicio y zinc como componentes estructurales y estroncio como agente modificador de la estructura. Se consiguen así estructuras bioactivas con rigidez suficiente. Sin embargo, estos implantes utilizados hoy día no solucionan completamente los problemas de biocompatibilidad típicos y no consiguen evitar la necesidad de antibióticos para evitar infecciones debidas al propio implante.

Los implantes metálicos utilizados actualmente en la sustitución de tejido óseo, extirpado por ejemplo como resultado de tumores, no han sido diseñados teniendo en cuenta la posible reaparición de células cancerígenas ni la actividad antibacteriana.

Se conoce la existencia de patentes y publicaciones relacionadas con el recubrimiento de capa delgada de hidroxiapatita utilizando la técnica de ablación por láser pulsado o PLD (B. León, J.A. Jansen, *"Thin calcium phosphates coatings for medical implants"* Springer, 2009, ISBN: 978-0-387-77718-4). La solicitud PCT/ES97/00269 propone la
5 técnica para la obtención de capas de HA pura como recubrimiento para implante metálico. Sin embargo no incluye ningún elemento químico que incorpore valor añadido a la propia HA y por tanto no afecta a la patentabilidad de la realización principal de la presente invención.

10

Hasta la fecha no se ha descrito la utilización del selenio como elemento sustituyente de recubrimientos de HA sintética. Estudios como los de Pereiro (I. Pereiro et al. *"Pulsed laser deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings"* E-MRS Spring Meeting 2011), que supone la publicación más cercana de la técnica,
15 proponen la posibilidad de sustituir la HA con Si y Sr por PLD. Estos metales se incorporan a la HA en un proceso de sustitución por el Ca y el P de la propia estructura de la HA. Otras estructuras descritas en la técnica incorporan F, que puede sustituir a grupos carbonatos presentes también en la estructura. Los inventores postulan que el Se podría sustituir a estos grupos carbonatos o al P en un
20 proceso que todavía no está bien identificado.

También existen estudios sobre la obtención de piezas en bloque o "bulk" de hidroxiapatita sustituida con selenio (Y. J. Lee *"Spectroscopic investigation of arsenate and selenate incorporation into hydroxylapatite"* Current Applied Physics 10,
25 2010, pp. 158-163). En este caso la HA es sustituida con Se pero mediante métodos químicos, y para obtener un material en el que el volumen es una variable condicionante. Esto lo diferencia de la presente invención que describe un recubrimiento de dimensiones micro o nanométricas, lo que determina y diferencia absolutamente sus propiedades.

30

No se ha especulado en la técnica con que un implante o un recubrimiento de implante óseo pueda tener ninguna propiedad beneficiosa para el huésped más allá de la idoneidad del propio implante y que promueva la osteogénesis. La idea de que
35 que pueda ofrecer ventajas intrínsecas como mejorar la osteointegración y servir al mismo tiempo de antioxidante, bactericida o antitumoral es novedosa y con esta

intención previa los inventores han ensayado el Se como sustituyente en la HA. El resultado muestra una integración del elemento en la estructura que ha resultado idónea, lo cual no era predecible, y una transferencia efectiva de sus propiedades terapéuticas que supone una ventaja definitiva sobre la técnica.

5

El problema que se planteaba entonces en la técnica era encontrar una alternativa a los recubrimientos de los implantes óseos que mejorara la osteointegración del implante. La solución que propone la presente invención es un recubrimiento de un material biocompatible típico, preferiblemente HA, con selenio incorporado como elemento modificante que favorece el desarrollo de tejido sano en el huesped, presenta propiedades bacteriológicas y es capaz de inhibir la proliferación de células cancerígenas.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De forma que la invención es un recubrimiento sintético de implante óseo que comprende una base de al menos un material bioactivo, preferiblemente hidroxiapatita, y selenio.

15

En la presente solicitud se entiende por "material bioactivo" aquel que posibilita una respuesta biológica específica en su interfaz de manera que favorece la formación de un enlace entre los tejidos vivos y dicho material.

20

En una realización de la invención, el porcentaje de selenio incorporado está comprendido hasta en un 5% en peso respecto al peso total del recubrimiento, que puede ser su límite de toxicidad in-vivo, y en una realización preferible dicho porcentaje es del 2,75%. En otra realización preferible, dicho recubrimiento comprende al menos un ión metálico adicional seleccionado entre el grupo compuesto por magnesio, estroncio, cromo, manganeso, zinc y silicio. En otra realización preferible para implantes dentales, comprende flúor.

25

30

Una realización muy preferible es el uso del recubrimiento de la invención para la fabricación de un implante óseo con recubrimiento útil para la recomposición del tejido óseo en un sujeto, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un paciente humano.

35

En la presente solicitud se entiende por "recomposición del tejido óseo" a la unión físicoquímica entre el material y el hueso vivo donde es implantado, verificable como crecimiento óseo en superficie del implante. Este proceso lleva implícito la osteogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos que son indispensables para
5 que los nutrientes lleguen a las células, y la propia osteointegración del material o unión con el tejido óseo vivo.

Otra realización más de la invención es el implante óseo que comprende un recubrimiento sintético de un material bioactivo como base, preferiblemente
10 hidroxiapatita, y selenio.

El resultado de la invención combina las excelentes propiedades osteointegradoras de la hidroxiapatita, por ejemplo, con la acción antibacteriana y antitumoral del selenio. El recubrimiento de la invención presenta además propiedades anti-
15 microbianas localizadas evitando la necesidad de administrar al paciente antibióticos genéricos.

En la obtención del recubrimiento de la invención, la cantidad de selenio incorporado depende de forma constante y lineal del contenido del elemento en el blanco de
20 ablación de partida, lo cual demuestra que el selenio es incorporado de forma eficaz (figuras 1 y 2).

La evaluación de la biocompatibilidad del material se ha llevado a cabo valorando su citotoxicidad al contacto con células vivas *in vitro* siguiendo los requisitos
25 establecidos en la ISO 10993-5:1999. En relación a esto, se han realizado dos pruebas celulares. La primera, mostrada en el Ejemplo 3, para comprobar la posible citotoxicidad de los extractos del biomaterial; es decir, el estado de las células tras su incubación en medio en el que previamente hemos introducido el material, que podría liberar al medio sustancias citotóxicas. El resultado es que a medida que se
30 aumenta la concentración del material de la invención en el medio, la actividad celular tanto del recubrimiento de HA-Se como del control negativo permanece constante o incluso aumenta ligeramente. El control positivo lleva los valores de viabilidad celular a cero, lo que valida los resultados.

La segunda prueba celular, mostrada en el Ejemplo 4, se ha llevado a cabo para demostrar el buen comportamiento de las células al contacto directo con el material, su anclaje y morfología a lo largo de distintos tiempos de incubación. Como controles de los ensayos se utilizaron uno negativo o no citotóxico, y otro positivo o citotóxico.

5

El recubrimiento obtenido es un fósforo de calcio que puede presentar una estructura tanto cristalina, tipo apatita, como amorfa dependiendo de las condiciones de procesamiento y composición del blanco de partida. Por este procedimiento también es posible producir recubrimientos de fosfato cálcico con otras estructuras cristalinas como el fosfato tricalcio (α/β -TCP). En cuanto a la incorporación del selenio en la estructura apatítica, tiene lugar mediante un proceso de sustitución iónica donde el selenio probablemente ocupa los lugares de los átomos de fósforo y/o carbono.

10

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: Micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectro de rayos X por dispersión de energías (EDS) de un recubrimiento de HA sustituida con Se obtenido por ablación láser. Se puede observar que el recubrimiento cubre toda la superficie del sustrato y que el análisis químico permite identificar, además de los elementos característicos de la hidroxiapatita (Ca, P, O), una clara señal atribuida al selenio indicadora de la incorporación efectiva de este elemento en el recubrimiento.

20

Figura 2: Porcentaje atómico de Se incorporado en los recubrimientos en función de su contenido atómico presente en los blancos de ablación. Estos datos han sido obtenidos mediante la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).

25

La relación obtenida se muestra en el cuadro siguiente.

Muestra	% Se
HA pura	-
HA + 2,5% Se	0,6
HA + 5,0% Se	1,3
HA + 7,5% Se	1,9
HA + 10,0% Se	2,7

Figura 3: Densidad óptica ($A_{595\text{ nm}} - A_{655\text{ nm}}$) proporcional a la cantidad de células viables frente a las distintas diluciones (0%, 30%, 50% y 100%) de los extractos del material y de los controles.

- 5 **Figura 4:** Micrografía de microscopía electrónica de barrido que muestra la línea pre-osteoblástica MC3T3-E1 creciendo sobre el recubrimiento de la invención tras un tiempo de incubación de 1 día. Las células presentan un estado saludable, con la morfología aplanada característica, adaptándose perfectamente a la superficie del material. Además presentan numerosos filopodios y lamelipodios mediante los que
- 10 se conectan unas a otras y a la superficie para continuar la formación de una monocapa que cubrirá, pasados unos días de incubación, toda la pieza.

MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

- Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en
- 15 ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Incorporación de Se en HA

- El proceso de incorporación de Selenio en hidroxiapatita se llevó a cabo en una cámara de vacío PLD. Se obtuvo una capa delgada de HA sobre sustratos de Ti sometidos previamente a un proceso de limpieza y pasivado, tras lo que se
- 20 colocaron en una cámara de vacío. En el interior de la cámara se aportó el blanco de ablación como material precursor del recubrimiento en forma de disco de 20 mm de diámetro y 2 g de masa, a partir de la mezcla y compactación de polvos de hidroxiapatita comercial (Plasma Biototal Capital-R) y selenio 99,99 % (Sigma-Aldrich), en las proporciones que se indican en la tabla siguiente.

Blanco de ablación:

HA pura
HA + 2,5 % Se
HA + 5,0 % Se
HA + 7,5 % Se
HA + 10,0 % Se

- Una vez cerrada la cámara de vacío, se inicia la retirada de gas del interior de la cámara mediante bomba de vacío hasta obtener 10^{-5} mbar de presión, y se calentó el sustrato a 400°C. Entonces se introdujo en la cámara vapor de agua de pureza
- 5 MiliQ para conseguir la atmósfera adecuada para el proceso de deposición. Una vez estabilizada una presión de agua de 0,45 mbar se sometió el blanco de ablación a radiación ultravioleta procedente de un láser de excímero que penetraba en la cámara a través de una ventana transparente a dicha radiación. El haz láser se focalizó por medio de un sistema de lentes a la superficie del material del blanco de
- 10 ablación. Como consecuencia de ello el Se es ablacionado y transportado hacia el sustrato de HA formándose una capa con una excelente adherencia.

Ejemplo 2: Producción de recubrimiento sintético de HA con 2,75% at. Selenio para ensayos *in vitro*.

- 15 Para obtener estos recubrimientos se utilizó un láser de excímero ($\lambda = 193$ nm) trabajando con una frecuencia de pulso de 10 Hz y con una densidad de energía de 3 J/cm^2 , presión de vapor del agua = 0,45 mbar (45 Pa), temperatura = 460°C, distancia blanco de ablación – sustrato titanio = 10 cm y velocidad de rotación del blanco = 3 rpm. Los sustratos de titanio fueron discos de 6 mm de diámetro
- 20 previamente limpiados según: (1) Baño ultrasónico en acetona durante 7 minutos, (2) Lavado con agua desionizada para eliminar la acetona, (3) Baño ultrasónico en ácido nítrico al 5% durante 7 minutos para pasivar la superficie, (4) Lavado con agua desionizada para eliminar el ácido nítrico, (5) Baño ultrasónico en metanol durante 7 minutos para diluir el agua y (6) Secado con un chorro de N_2 . Los recubrimientos así
- 25 obtenidos presentaron una composición básica de fosfato cálcico carbonatado con un contenido de 0,6 at% de selenio. Una vez obtenidos los recubrimientos sobre los discos de titanio, fueron sometidos a esterilización mediante rayos Gamma para seguidamente proceder a realizar el protocolo estándar de los ensayos *in vitro* de los

siguientes Ejemplos 3 y 4. La biocompatibilidad del material a patentar se evaluó *in vitro* siguiendo los requisitos establecidos en la norma ISO 10993-5:1999. La línea celular utilizada fue la MC3T3-E1, que contiene preosteoblastos obtenidos a partir de explantes de cráneo de ratón C57BL/6 (ECACC, Nº Catálogo: 99072810).

5

Ejemplo 3: Evaluación de la citotoxicidad de los extractos de los materiales.

Se evaluó la citotoxicidad entendida como el estado de las células ensayadas tras su incubación con medio en el que previamente se había introducido el material, ya que éste podría liberar al medio sustancias citotóxicas. Para obtener el extracto del material, cada pieza se introdujo en medio de cultivo α -MEM suplementado con 10% de suero (FBS) y se mantuvo a 37°C con agitación constante de 60 r.p.m. durante 24 horas. La relación área de material/ volumen de extracto fue de 2 cm² de material/ 1 ml de medio. Como control positivo de citotoxicidad se utilizó una solución de fenol a una concentración de 6,4 g/L en α -MEM y como control negativo el propio medio de cultivo. Ambos controles se sometieron al mismo proceso. Pasadas las 24 horas se retiró el material, se recogieron en todos los extractos incluidos los controles y se diluyeron con medio de cultivo fresco para obtener 100, 50, 30 y 0% de la concentración del extracto original. Las diluciones se congelaron a -20°C hasta su uso. A continuación se sembró un volumen de 100 μ l de suspensión de células MC3T3-E1 a una concentración de 4×10^5 cel/ml en medio de cultivo en placa de 96 pocillos y las células se incubaron durante 3 días. Al cabo de este periodo se retiró el medio y se añadió a cada pocillo la dilución de extracto correspondiente obteniendo tres réplicas por material por dilución. Las células se incubaron con los extractos durante 24 horas. Tras ese período se añadió a cada pocillo un volumen de 10 μ l de 0,5 mg/mL de MTT disuelto en una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se trata de un test colorimétrico de MTT (Roche Molecular Biochemicals) basado en la reducción de la sal, de color amarillo, MTT (3-(4,5-dimethyltyazolyl-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que sólo está presente en células vivas. La placa se incubó durante 4 horas bajo las condiciones de cultivo (37°C, 5% CO₂ y atmósfera húmeda) para permitir la reducción de ese MTT a cristales de formazán insolubles de color púrpura. Pasado ese tiempo y para disolver los cristales se añadieron 100 μ L a cada pocillo de una solución que contenía 10% de SDS en 0,01 M de HCl. La placa se incubó toda la noche y la densidad óptica de la solución coloreada final, que es una medida

indirecta de la cantidad de células vivas que hay en cada pocillo, se cuantificó a 595 nm y 655 nm utilizando un lector de placas BIO-RAD iMark™ (figura 3).

Ejemplo 4: Evaluación de la morfología celular en respuesta al contacto directo con el material

Se evaluó el comportamiento de las células MC3T3-E1 al contacto directo con el material, su anclaje y morfología a lo largo de distintos tiempos de incubación. Para analizar la morfología de las células a lo largo de varios días de incubación sobre HA-Se, las piezas recubiertas con HA-Se se incubaron con 100 µl de suspensión celular a $1,7 \times 10^5$ cel/ml de medio de cultivo en placas de 96 pocillos. Tras cada uno de los tiempos de incubación de 1 día marcados se extrajo de la incubadora la placa correspondiente, se retiró el medio de cultivo y se fijaron las células para su observación al microscopio electrónico de barrido (SEM) cubriendo el material con 2% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1M a pH 7,4 y se deshidrataron aplicando diluciones de acetona graduales (30%, 50%, 70%, 80%, 95%) y acetona pura. El punto crítico de CO₂ a 75 atmósferas y 31,3 °C es el paso final. La muestra finalmente se monta en soportes metálicos, se recubre con oro y se analiza en el microscopio electrónico de barrido Philips XL 30 (CACTI). Mediante este estudio podemos valorar la morfología de las células sobre el material, comprobando que su crecimiento ha sido saludable (figura 4).

Ejemplo 5: Evaluación de la actividad anticancerígena

Para analizar el efecto anticancerígeno de este material se evalúa la densidad de osteoblastos sanos y tumorales sobre las piezas recubiertas con HA-Se al 2,75% utilizando un recubrimiento de HA pura como control. Una densidad de $5,5 \times 10^5$ cél/ml de osteoblastos sanos (pre-osteoblastos de ratón MC3T3-E1) y de osteoblastos tumorales (osteosarcoma humano MG-63) se incubaron (37°C, 5% de CO₂, 95% de humedad relativa) en sus respectivos medios (α-MEM y DMEM) ambos suplementados con un 10% de suero bovino fetal, durante 1 y 3 días. El medio se renovó a los 2 días. Pasados los tiempos de incubación, la viabilidad celular en cada material se estimó utilizando el test de MTT según el Ejemplo 3. La densidad de células cancerígenas se redujo significativamente a medida que el porcentaje de Selenio en el recubrimiento aumento hasta un 5% mientras que la densidad de células sanas se incrementó. Estos estudios muestran que dentro del rango de Se

estudiado se inhibieron las funciones de las células cancerígenas. En particular, para el porcentaje de selenio del 5% incorporado en la matriz de la HA, se encontró una reducción de la actividad celular cancerígena de hasta un 50% comparado con un recubrimiento convencional de HA.

5

Ejemplo 6: Evaluación de la actividad antibacteriana

Para probar el efecto antibacteriano se sembraron cultivos de bacterias del tipo *Staphylococcus aureus* sobre las piezas recubiertas con HA-Se al 2,75%, utilizando un recubrimiento de HA pura como control. Para ello, se mantuvo un cultivo de *S.*

10 *aureus* con agitación constante y a 37 °C durante una noche. Tras ese período se lavó con una solución fosfato salina pH 7,4 (PBS) y se le añadió medio fresco. Se volvió a incubar en las mismas condiciones durante 4 horas más para permitir que siguiera creciendo hasta una densidad óptica a 600 nm (OD 600) de 1. Se lavó de nuevo el cultivo con PBS y se diluyó en serie 10 veces hasta obtener una dilución de

15 1×10^{-5} . Se tomaron 5 μ l de esta dilución y se añadió a cada una de las piezas (HA-Se y HA). Los discos inoculados se colocaron en placas de agar que se invirtieron e incubaron a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, cada disco se lavó dos veces con PBS esterilizado para retirar las bacterias plantónicas, es decir, las que no han quedado adheridas al disco. Los discos se transfirieron a microtubos con 1ml de PBS

20 para el recuento de las bacterias en los *biofilm* formados sobre cada uno de ellos. Para separar las células adheridas de la matriz del *biofilm*, los microtubos se agitaron durante 1 minuto a 2500 rpm, repitiendo este proceso 3 veces con descanso de unos segundos entre cada uno. Finalmente se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias desglosadas por cada disco, y se hicieron los cálculos

25 teniendo en cuenta la dilución añadida. Los resultados obtenidos demuestran una reducción del *biofilm* de hasta un 40% comparado con un recubrimiento de HA sin ningún porcentaje de selenio .

REIVINDICACIONES

1. Recubrimiento sintético de implante óseo que comprende como base al menos un material bioactivo y selenio.
- 5 2. Un recubrimiento según la reivindicación 1, en que dicho material bioactivo es hidroxiapatita.
3. Un recubrimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, en que dicho selenio está incorporado en un porcentaje de hasta un 5% en peso respecto a la composición total del recubrimiento.
- 10 4. Un recubrimiento según la reivindicación 3, en que dicho porcentaje de selenio incorporado es del 2,75% en peso respecto a la composición total del recubrimiento.
5. Un recubrimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende al menos un ión metálico adicional seleccionado entre el grupo compuesto por magnesio, estroncio, cromo, manganeso, zinc y silicio.
- 15 6. Un recubrimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende flúor.
7. Uso de un recubrimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la fabricación de un implante óseo con recubrimiento útil para la recomposición del tejido óseo en un sujeto.
- 20 8. Uso según la reivindicación 7, en que dicho sujeto es un mamífero.
9. Uso según la reivindicación 8, en que dicho mamífero es un paciente humano.
10. Implante óseo que comprende un recubrimiento sintético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, de un material bioactivo como base y selenio.
- 25 11. Implante óseo, según reivindicación 10, en que dicho material bioactivo es hidroxiapatita.

Figura 1

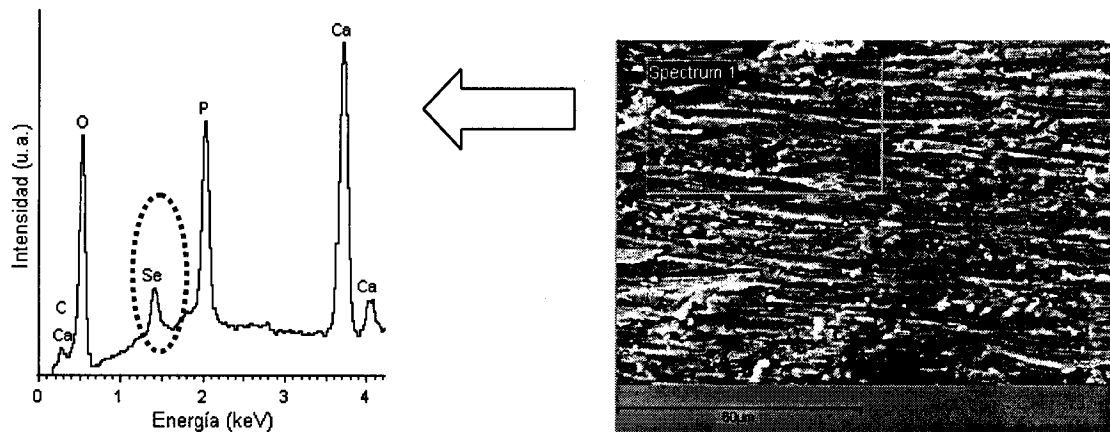


Figura 2

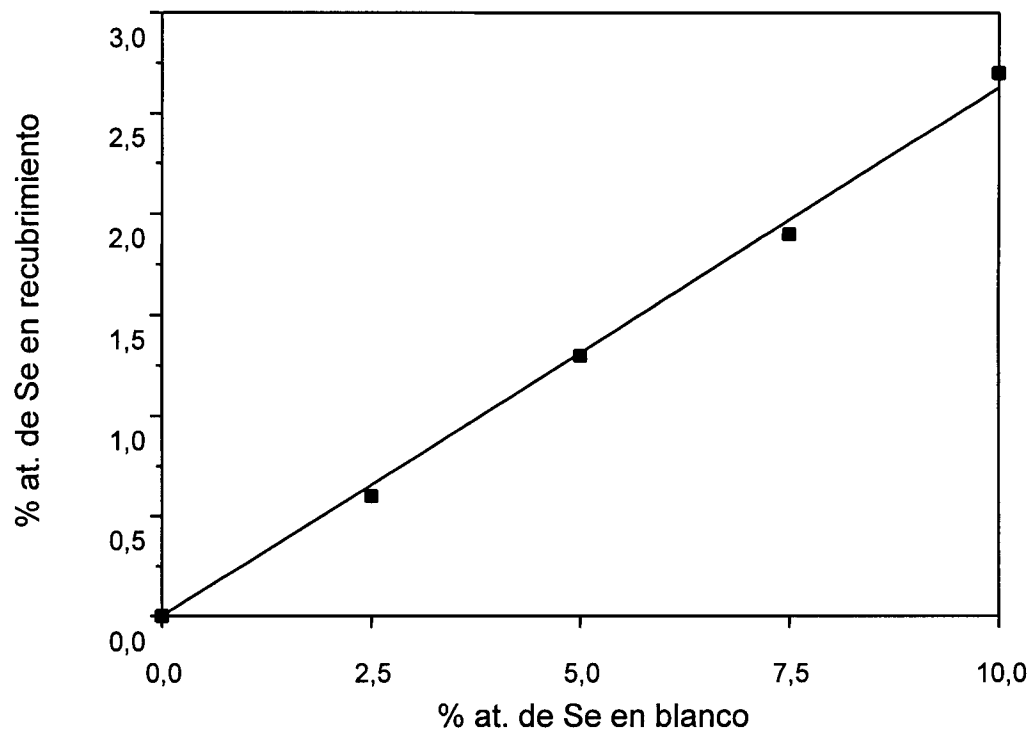


Figura 3

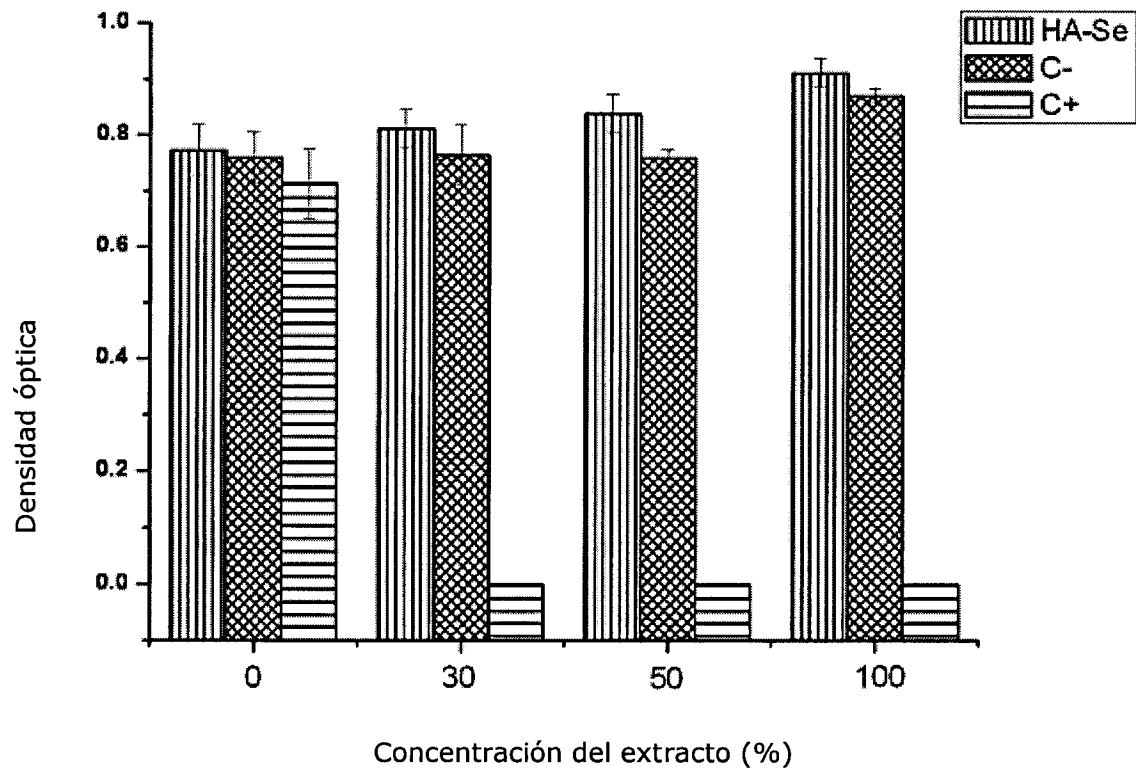
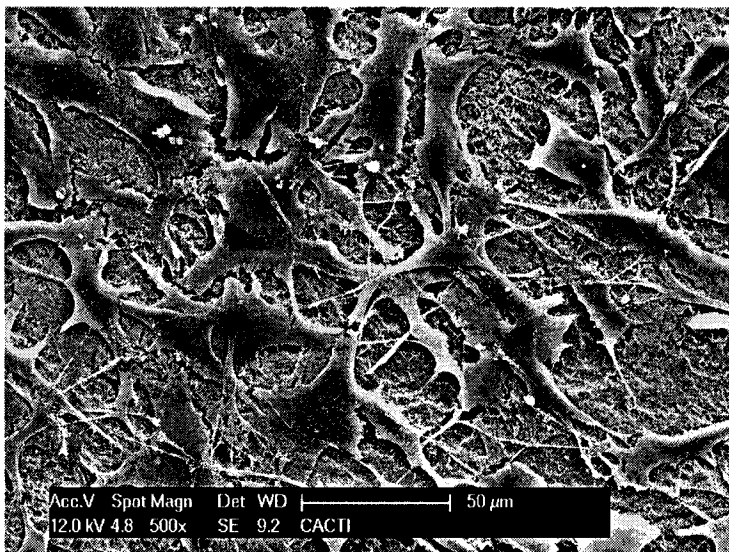


Figura 4





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100999

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.09.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GB 2459372 A (ZIRCOTEC LIMITED) 28.10.2009, todo el documento especialmente las reivindicaciones 6,35-39,47,56,87,90,106.	1-11
Y	DE 102004021739 A1 (HERAEUS KULZER GMBH.) 24.11.2005, todo el documento.	1-11
A	US 20100094419 (KIM et al.) 15.04.2010, todo el documento.	1-11
A	US 20100173009 A1 (GIBSON et al.) 08.07.2010, todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.03.2012

Examinador
A. Amaro Roldan

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61F2/02 (2006.01)

A61F2/28 (2006.01)

A61L27/04 (2006.01)

A61L27/30 (2006.01)

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

A61F, A61L

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GB 2459372 A (ZIRCOTEC LIMITED)	28.10.2009
D02	DE 102004021739 A1 (HERAEUS KULZER GMBH.)	24.11.2005
D03	US 20100094419 (KIM et al.)	15.04.2010
D04	US 20100173009 A1 (GIBSON et al.)	08.07.2010

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

La presente invención se refiere a un recubrimiento sintético de implante óseo que comprende como base al menos un material bioactivo, como la hidroxiapatita, y selenio hasta un 5%, siendo su cantidad preferida de 2,75%, ambos % en peso de la composición. Dicho recubrimiento comprende al menos un ión metálico adicional seleccionado entre magnesio, estroncio, cromo, manganeso, zinc o silicio y además puede comprender flúor (reivindicaciones 1-6). Dicho recubrimiento se puede utilizar para la fabricación de un implante óseo para la recomposición del tejido óseo en un sujeto, el cual puede ser un mamífero o un sujeto humano (reivindicaciones 7-9). Se incluye en la invención el implante óseo que posee el recubrimiento (reivindicaciones 10-11) y según la evaluación de los extractos de los materiales empleados en los ejemplos, dicho recubrimiento presenta propiedades antibacterianas y anticancerígenas.

D1 se refiere en general a un sustrato orgánico con un recubrimiento de varias capas para distintos objetos. Cuando se trata de recubrir un hueso o un diente se añade otra capa de recubrimiento formada por hidroxiapatita). El material del recubrimiento puede incluir uno o más de los siguientes elementos: cobre, aluminio, plata, oro, plomo o cinc (reivindicaciones 6, 18-20, 36-39, 46-61, 87, 89-90 y 106).

D2 se refiere a implantes medicinales que tienen una capa cuya superficie es porosa y se caracterizan porque dicha capa contiene selenio, entre 0,01% y 1,1% (reivindicaciones 1 y 4). Dicho implante también puede tener titanio u otras aleaciones, así como una capa de fosfato cálcico (reivindicaciones 2-3). El procedimiento de fabricación del implante es por medio de la oxidación anódica de electrolitos (reivindicación 5). Dichos electrolitos se encuentran en forma alcalina en concentraciones de 0,1% a 1,5% (reivindicación 6), los cuales pueden ser de azufre y/o ácido fosfórico (reivindicación 7).

D3 se refiere a un compuesto poroso que comprende hidroxiapatita sustituida por silicio y fosfato tricálcico (50-90% : 10-50%), y el método para prepararlo. Dicho compuesto poroso puede utilizarse como material para reparar un tejido óseo o como material de injerto en el hueso que puede sustituir a tejido duro humano.

D4 se refiere a una hidroxiapatita que se utiliza como un biomaterial y tiene una proporción molar de Ca/P de 2.05 a 2.55 y una razón molar de Ca/(P+Si) menor de 1,66. Dicha hidroxiapatita puede no contener iones carbonato.

Los documentos D3 y D4 se consideran como pertenecientes al estado de la técnica en general.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

A la vista de los documentos citados se considera que las reivindicaciones 1-11 cumplen con los requisitos de novedad del Art. 6 de la LP 11/86.

Sin embargo, a la vista de los documentos D1 y D2 se considera obvio hacer un recubrimiento de implante óseo que comprende hidroxiapatita y selenio y que además contenga opcionalmente cinc. Además las cantidades de las reivindicaciones 3 y 4 o el hecho de aportar flúor a la combinación no produce ningún efecto sorprendente por lo que las reivindicaciones 1-11 carecen de actividad inventiva (Art. 8 LP 11/86).