



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 360 437**

⑫ Número de solicitud: 200931034

⑬ Int. Cl.:

D01F 9/00 (2006.01)

D01D 5/10 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **20.11.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
06.06.2011

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Gimeno Alcañiz, José V.;**
Ocio Zapata, María J.;
Torres Giner, Sergio y
Lagarón Cabello, José M.

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Desarrollo de recubrimientos electroestirados bioactivos para aplicaciones biomédicas.**

㉑ Resumen:

Desarrollo de recubrimientos electroestirados bioactivos para aplicaciones biomédicas.

La presente invención se refiere a una composición bioactiva obtenida por la técnica de electroestirado y compuesta por al menos un polímero. Además, la invención también describe un procedimiento de incorporación de esta composición, bioactiva electroestirada, a modo de recubrimiento sobre una matriz plástica para obtener materiales compuestos para su uso en implantes biomédicos y en ingeniería de tejidos, tanto biodegradables como no biodegradables.

ES 2 360 437 A1

DESCRIPCIÓN

Desarrollo de recubrimientos electroestirados bioactivos para aplicaciones biomédicas

La presente invención se refiere a una composición bioactiva obtenida por la técnica de electroestirado y compuesta por al menos un polímero. Además, la invención también describe un procedimiento de incorporación de esta composición a modo de recubrimiento sobre una matriz plástica para obtener materiales compuestos para su uso en implantes biomédicos y en ingeniería de tejidos.

Estado de la técnica anterior

Durante los últimos años, ha surgido un considerable interés en el procesado de materiales poliméricos a escala nano- y submicro-métrica, y muy en particular, en forma de fibras. De entre las diferentes técnicas que se pueden emplear para la fabricación de estas fibras ultra-finas, la técnica del electroestirado ("electrospinning") es actualmente la más utilizada. Este proceso, patentado hace más de cien años, (US Patent, 705 691, 1902) se fundamenta en la creación de una elevada diferencia de potencial entre un capilar, el cual contiene una solución polimérica, y un soporte metálico, sobre el cual se depositan las fibras. En función de los parámetros del equipo y las características de la solución polimérica, no sólo se pueden obtener fibras, sino también otras morfologías tales como láminas, tubos y esferas (Torres-Giner S, Gimenez E, Lagaron JM. Characterization of the morphology and thermal properties of zein prolamine nanostructures obtained by electrospinning. Food Hydrocolloids 22 (4): 601, 2008). La principal actividad investigadora del uso de este tipo de estructuras ultrafinas está siendo enfocada a su uso como materiales bioactivos, tales como nanofibras antimicrobianas (Torres-Giner S, Ocio MJ, Lagaron JM. Development of active antimicrobial fiber-based chitosan polysaccharide nanostructures using electrospinning. Engineering of Life Science 8 (3): 303, 2008; Torres-Giner S, Ocio MJ, Lagaron JM. Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blends obtained by electrospinning. Carbohydrate Polymers 77(2):261, 2009), submicro-encapsulación de alimentos funcionales (Fernández A, Torres-Giner S, Lagaron JM. Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. Food Hydrocolloids 23(5):1427, 2009) y fundamentalmente, y más recientemente, como soportes para el crecimiento celular (Torres-Giner S, Gimeno-Alcañiz JV, Ocio MJ, Lagaron JM. Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods. ACS Applied Materials & Interfaces 1 (1): 218, 2009).

Debido al reducido diámetro de las fibras electroestiradas, mayoritariamente submicro-métrico, los recubrimientos basados en redes de estas fibras poseen una alta similitud morfológica con la superficie de tejidos como huesos, piel, músculos, así como paredes de ciertos órganos. Además, estas fibras pueden ser biocompatibles y biodegradables, con lo que si además no son citotóxicas (no resultan dañinas para las células), pueden ser también reabsorbibles metabólicamente de forma natural por el cuerpo. De este modo, el funcionamiento biológico de un tejido, que está regulado por ciertas señales biológicas, puede ser controlado para favorecer la actividad celular sobre la superficie de estos materiales. Mediante estudios *in*

vitro se ha podido demostrar que el crecimiento de líneas celulares sobre los recubrimientos electroestirados está favorecido (Torres-Giner S, Gimeno-Alcañiz JV, Ocio MJ, Lagaron JM. Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods. ACS Applied Materials & Interfaces 1 (1): 218, 2009).

El objetivo final de los recubrimientos electroestirados en el campo de la ingeniería de tejidos generalmente es el de producir un soporte o andamio ("scaffold") para el crecimiento celular. De esta forma, órganos y tejidos dañados pueden ser parcialmente recubiertos por fibras electroestiradas para remplazarlos temporalmente hasta que las propias células sean capaces de poblar y sintetizar de nuevo el tejido original. Con el objetivo de imitar la composición química de las paredes y tejidos celulares biológicos, se han patentado recubrimientos consistentes en proteínas, especialmente aquellas provenientes de la matriz extracelular de mamíferos, como colágeno o elastina (US Patent 0213389 A1, 2008). No obstante, recientes estudios demuestran que el uso directo de este tipo de matrices proteicas podría no ser suficientemente adecuado porque no cumplen con ciertos requisitos básicos para favorecer adecuadamente el soporte celular, tales como insuficiente resistencia enzimática, rápida disolución en agua y baja bioestabilidad térmica y mecánica. Otras reivindicaciones se basan en la adición de polímeros sintéticos en la composición del polímero electroestirado, (US Patent 0263417 A1, 2006), para que de este modo se resuelvan los problemas anteriormente citados. Sin embargo, muchas de estas composiciones sintéticas carecerían de suficiente resistencia térmica para permitir su esterilización y fijación por temperatura. Desgraciadamente, el proceso de esterilización resulta clave en cualquier aplicación biomédica dado que en esta etapa se elimina totalmente la carga microbiana de un producto sanitario para poder utilizarlo asépticamente en un procedimiento quirúrgico. Los métodos térmicos, tanto calor seco como húmedo, suelen ser los más adecuados, a la vez que cómodos, para esterilizar cualquier material de implante ó dispositivo biomédico.

Por otra parte, el objetivo final más habitual del electroestirado es crear un recubrimiento en forma de interfase en el implante y esto generalmente se realiza por medio de la aplicación directa sobre el implante del proceso de electroestirado. Sin embargo, uno de los problemas más frecuentes de las interfaces basadas en fibras electroestiradas es la dificultad de asegurar la unión entre el implante y su recubrimiento, lo que puede comprometer la futura integridad del implante. De hecho, una insuficiente fijación entre ambos podría limitar muy considerablemente su aplicación dado que podrían no resistir la manipulación durante la cirugía o las posteriores cargas *in vivo* (Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 45 (2): 113, 1998).

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una composición bioactiva obtenida por la técnica del electroestirado que por sus características técnicas puede soportar procesos de esterilización térmica para su aplicación en implantes biomédicos e ingeniería de tejidos.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición bioactiva obtenida por un procedimiento de electroestirado que comprende al

menos un polímero que se selecciona entre poliésteres, policetonas, polisacáridos, proteínas estables térmicamente o cualquiera de sus mezclas.

En la presente invención, se entiende por bioactividad la capacidad que posee un material para inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor, así un material bioactivo es aquel que posibilita una respuesta biológica específica en su interfase de los tejidos, favoreciendo la unión de ambos.

Los poliésteres de la composición bioactiva en una realización preferida se seleccionan de una lista que comprende: ácido poliglicólico (PGA), ácido poli(glicólico-co-láctico) (PGLA), ácido poli-L-láctico (PLLA), polihidroxialcanoatos, policaprolactonas (PCL) y cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, las policetonas de la composición bioactiva se seleccionan de una lista que comprende: poliéter éter cetona (PEEK) y poliéter éter cetona sulfonado (S-PEEK).

En otra realización preferida las proteínas de la composición bioactiva se seleccionan de una lista que comprende: zeína, proteína de soja y cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, los polisacáridos de la composición bioactiva se seleccionan de una lista que comprende: celulosa, quitosano y cualquiera de sus combinaciones.

De forma adicional, la composición bioactiva contiene preferiblemente al menos un material biocerámico, siendo más preferiblemente hidroxiapatita u otros minerales basados en calcio y/o fósforo, especialmente indicado para su aplicación en tejidos óseos.

También de forma adicional, la composición bioactiva contiene preferiblemente un fármaco, siendo más preferiblemente un antiinflamatorio, un antibiótico, un analgésico o cualquiera de sus combinaciones.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de la composición descrita anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

- a. Homogenización de una composición precursora que comprende un polímero que se selecciona entre un poliéster, una policetona, una proteína estable térmicamente, un polisacárido o cualquiera de sus combinaciones, y al menos un disolvente, siendo el disolvente más preferiblemente orgánico, un alcohol y aún más preferiblemente hexafluoro-2-propanol.
- b. Electroestirado estático o dinámico de la composición precursora obtenida en la etapa (a) aplicando una diferencia de potencial entre el capilar que contiene la composición y el colector sobre el que se deposita, el cual está opuestamente cargado. El alto voltaje aplicado es capaz de generar un chorro ("jet") del polímero previamente disuelto, que en su transcurso se alarga, endurece y seca (se evapora el disolvente de forma prácticamente completa) para ser recogido en el colector en forma de fibra u otra estructura de tamaño ultra-fino.
- c. Tratamiento de esterilización de la composición obtenida en la etapa (b).

En una realización preferida del procedimiento,

adicionalmente, durante la etapa (a), se adiciona un material biocerámico, un fármaco o ambos, y más preferiblemente entre un 0,001 y 90% en peso respecto al polímero(s).

Preferiblemente el procedimiento además comprende un post-tratamiento, que puede ser después de la etapa (a), después de la etapa (b) o después de la etapa (c), y siendo éste post-tratamiento una reacción de entrecruzamiento y/o lavado, dicho entrecruzamiento se realiza tanto por métodos químicos como físicos, para facilitar la posterior adhesión implante-interfase o mejorar la resistencia térmica, y el lavado se realiza para eliminar algún componente no deseado de la composición.

La homogenización de la etapa (a) se realiza preferiblemente por agitación mecánica, de acuerdo las condiciones necesarias para disolver los polímeros empleados y siendo la relación polímero(s) - disolvente del 0,01 al 95% en peso.

El electroestirado de la etapa (b) preferiblemente se realiza en unas condiciones en la que la distancia entre el capilar y el soporte es de 1-200 cm, una velocidad de deposición entre 0,001-100 ml/h y aplicando un voltaje entre 1-100 kV. Más preferiblemente se realiza a una distancia entre 5-50 cm, una velocidad de deposición entre 0,01-10 ml/h y un voltaje entre 5-25 kV.

La técnica del electroestirado permite obtener recubrimientos basados generalmente en fibras de tamaño submicro-métrico a partir de un amplio rango de polímeros biocompatibles y biodegradables. Debido al tamaño de las fibras, los recubrimientos electroestirados pueden mimetizar la estructura real de tejidos y órganos vivos, lo que favorece la adhesión, crecimiento, migración y diferenciación celular. Por otra parte, los materiales con un mayor futuro como base de los implantes son también poliméricos, pudiendo ser tanto temporales como permanentes.

Esta técnica de electroestirado de fibras permite obtener a escala submicro- o nano-métrica fibras a partir de una composición precursora. El electroestirado comparte las características tanto del electropulverizado como de la solución convencional el hilado en seco de fibras. El proceso es no invasivo y no requiere el empleo de química de coagulación o altas temperaturas para producir la producción de las fibras. En el electroestirado, las fibras producidas se encuentran prácticamente libres de disolvente. En algunos casos pueden quedar trazas de los mismos, no obstante durante el proceso térmico de la etapa (c), éstas suelen ser completamente eliminadas de forma que ningún solvente es transferido al producto final.

Las características físico-químicas de la composición de la presente invención permiten que pueda ser esterilizada por cualquier método de esterilización conocido. La posibilidad de esterilización, gracias a la elevada resistencia térmica de los polímeros empleados en la composición es una gran ventaja, ya que en una realización preferida el tratamiento de esterilización de la etapa (c) se realiza por un método térmico, ya sea húmedo o seco, realizándose el método húmedo en una realización más preferida en autoclave a una temperatura comprendida en un intervalo entre 60 y 200°C durante un tiempo de al menos 15 min. En una realización aún más preferida, la aplicación de calor húmedo se realiza en autoclave a una temperatura entre 100 y 135°C.

Y el método seco de esterilización en otra realiza-

ción más preferida se lleva a cabo en un horno a una temperatura entre 100 y 300°C durante un tiempo de 1 minuto a 4 horas. Estos métodos térmicos tanto por calor seco como húmedo, son los más adecuados y sencillos para esterilizar cualquier material que vaya a ser implantado.

En algunos casos, se ha observado que el tratamiento de esterilización a alta temperatura también puede incluso incrementar la bioactividad del recubrimiento. Esto podría producirse por un cambio morfológico de las fibras que constituyen el recubrimiento.

Durante la etapa de esterilización en (c), si ésta se realiza mediante temperatura, y si además el implante sobre el cual se recubre con las fibras electroestiradas es plástico o su superficie posee características termoplásticas, será posible fijar mediante calor las fibras al implante de modo adicional. De esta forma se permite el desarrollo de materiales compuestos, interfase-matriz plástica, mediante recubrimientos electroestirados adheridos sobre una matriz polimérica, estableciendo una unión física o química entre las dos fases, a través de un tratamiento térmico. La técnica de unión consiste, en particular, en recubrir directa (*in-situ*) o indirectamente (*on-*, *at-* o *off-situ*) fibras electroestiradas sobre un termoestable, sin curar o pre-curado, y posteriormente someter a curado el conjunto. Al estar fijado al implante, el propio recubrimiento es capaz de resistir mejor las cargas mecánicas y de manipulación durante la cirugía. Por tanto, el empleo de un implante compuesto basado en una matriz polimérica con fibras electroestiradas incorporadas y fijadas en su superficie induce el crecimiento celular, en general, e integra el implante al tejido vivo, en la particular.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición electroestirada descrita anteriormente en aplicaciones biomédicas. Donde las aplicaciones biomédicas se selecciona de una lista que comprende la fabricación de prótesis e implantes, el recubrimiento de implantes, fabricación de suturas, sustitución directa de tejidos, tanto de replazo permanente como temporal, en huesos, piel, músculos y órganos dañados, y como sistema de liberación controlada de fármacos.

Por "implante", en la presente invención, se entiende un dispositivo, prótesis o sustancia de un material sintético o natural que se coloca en el cuerpo con la intención de curar, corregir algún problema de salud o con fines estéticos.

Por "sistema de liberación controlada de fármacos", en la presente invención, se entiende a una forma de administrar fármacos localmente, donde el fármaco se incorpora en una cantidad necesaria al recubrimiento del implante, y se libera específicamente durante un periodo de tiempo en el lugar donde ha sido incorporado el implante, actuando de modo efectivo y preciso para favorecer un proceso de curación y sin necesidad de aplicarse de forma sistémica.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un material que comprende una matriz plástica recubierta por la composición electroestirada bioactiva descrita anteriormente.

La matriz plástica preferiblemente comprende un polímero termoestable, un polímero elastomérico o un polímero termoplástico.

El polímero termoestable más preferiblemente se selecciona de la lista que comprende resinas acrílicas, resinas epoxi, poliésteres insaturados, policetonas, resinas fenólicas, poliimidas, poliuretanos, sili-

conas, cauchos, gomas naturales o cualquiera de sus combinaciones. Estando aún más preferiblemente este polímero termoestable curado, sin curar o pre-curado.

En el caso de los polímeros termoplásticos, la adhesión se consigue por tratamiento térmico seguido de reblandecimiento y difusión en la interfase y/o reacción entre el implante y el recubrimiento. Los polímeros termoplásticos más preferiblemente se selecciona de la lista que comprende biopolímeros empleados en el área biomédica tales como poliésteres, polioles, poliuretanos, policetonas, poliamidas biodegradables, polisacaridos y proteínas. Siendo los biopoliésteres aún más preferiblemente: ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli(hidroxibutanoatos) (PHBs), poli(hidroxialcanoatos) (PHAs), policaprolactonas (PCL) o cualquiera de sus combinaciones. Y los polioles aún más preferiblemente: polisacáridos, polialcohol de vinilo (PVOH), sus copolímeros con etileno (EVOH) o cualquiera de sus mezclas.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del material de matriz plástica recubierto con la composición bioactiva electroestirada, que comprende las siguientes etapas:

- a. recubrir una matriz plástica con la composición descrita anteriormente.
- b. realizar un tratamiento térmico de adhesión de la composición obtenida en la etapa (a) sobre la matriz.

En una realización preferida del procedimiento el recubrimiento de la etapa (a) se lleva a cabo de forma simultánea al electroestirado.

Con este procedimiento se logra una óptima adhesión del recubrimiento sobre el implante, lo que resulta clave en el éxito clínico.

Preferiblemente, si el polímero es termoestable el tratamiento térmico de adhesión es un tratamiento de curado que se realiza a un intervalo de temperaturas de 70 a 300°C y durante un tiempo de 0,1 minutos a 5 horas.

El tratamiento térmico de curado no solo va a otorgar una excelente adhesión entre el recubrimiento de las fibras electroestiradas y el implante plástico, sino también va a aumentar el entrecruzamiento del polímero.

Preferiblemente, si el polímero es termoplástico este tratamiento térmico de adhesión se va a realizar a temperaturas en las que el polímero está plastificado.

Preferiblemente, la propia etapa (b) puede ser a su vez un proceso de esterilización térmica, o de forma adicional, se puede efectuar una etapa de esterilización posterior a esta etapa (b).

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere al uso de este material de matriz plástica recubierta por la composición electroestirada bioactiva, como implante biocompatible permanente o reabsorbible.

Las características que deben cumplir en cada caso los implantes biocompatibles son:

- Implantes permanentes: Se requiere en este caso que el polímero que constituye la matriz plástica no modifique sus propiedades físicas durante la vida del implante.
- Implantes reabsorbibles: Se utilizan para ello polímeros biodegradables, tanto en la matriz

plástica como en la interfase, esto es, materiales que, después de cumplir su función, se biodegraden y se reduzcan a moléculas pequeñas que se integren a los ciclos biológicos habituales del organismo vivo. Es un implante temporal.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra las fibras de PGLA, antes y después del tratamiento térmico, tomadas por un microscopio de barrido electrónico.

Fig. 2. Muestra el crecimiento celular en función del tiempo de ambos recubrimientos, sin tratar y con calor, y de un film obtenido por casting (formado por evaporación de disolvente) a partir de la misma disolución polimérica empleada en el proceso de electroestirado.

Fig. 3. Muestra las fibras de zeína, antes y después del tratamiento térmico tomadas por un microscopio de barrido electrónico.

Fig. 4. Muestra los resultados del crecimiento celular, mostrando que existe un ligero descenso del crecimiento en los primeros días tras el proceso térmico, muy posiblemente debido al mayor tamaño de las fibras.

Fig. 5. Muestra la resina acrílica antes y después de ser recubierta con las fibras de PGA después de la fijación con temperatura.

Fig. 6. Muestra en detalle, por microscopio de barrido electrónico, la morfología de unas fibras de PGA que se encuentran recubriendo una resina acrílica.

Fig. 7. Muestra el crecimiento celular en función del tiempo de una resina acrílica recubierta con fibras electroestiradas de PGA. Este crecimiento fue comparado con el obtenido en la misma resina acrílica sin recubrir y con el del mismo recubrimiento de fibras de PGA pero sobre un soporte inerte (papel de aluminio). Además, se compara el crecimiento entre el recubrimiento sobre la resina con el obtenido sobre un soporte inerte.

Fig. 8 muestra el film de PLA antes y después del proceso de electroestirado más el calentamiento.

Fig. 9. muestra el crecimiento celular en función del tiempo del film de PLA recubierto con fibras electroestiradas de PGA.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la composición bioactiva obtenida por el procedimiento de electroestirado usado de forma individual o como interfase entre un implante plástico y el tejido vivo, en ambos casos induciendo al crecimiento celular e integrándose el implante al tejido vivo.

Ejemplo 1

A modo de ejemplo, se presenta la descripción de la obtención de un recubrimiento de fibras electroes-

tiradas de un poliéster esterilizado por calor húmedo. Inicialmente, 5 g de ácido poli(glicólico-co-láctico) (PGLA) son completamente disueltos en 95 g de hexafluoruro de propanol. A continuación, la disolución polimérica anteriormente obtenida es electroestirada en las siguientes condiciones: 10 kV, 0.15 ml/h y 15 cm. Posteriormente, las fibras son recogidas en un colector metálico y son introducidas en el autoclave a 121°C durante 20 min para su completa esterilización. Las imágenes de la figura 1 muestran las fibras de PGLA, antes y después del tratamiento térmico, tomadas por un microscopio de barrido electrónico. En estas imágenes se muestra cómo en el recubrimiento se mantiene la estructura fibrilar original, en ambos casos por debajo de la micra, pero las fibras térmicamente tratadas presentan un tamaño ligeramente menor y además, tiene lugar la aparición de morfología porosa. Por su topografía, se considera que el recubrimiento posee características biomiméticas (simula la estructura real de los tejidos vivos) y por tanto alta bioactividad celular. Finalmente, para comprobar lo anteriormente mencionado, mediante un ensayo *in vitro* de viabilidad celular se determinó la bioactividad. Para ello, osteoblastos (células óseas) de la línea celular MG-63 en medio Eagle enriquecido con nutrientes son añadidos a los recubrimientos en una concentración de 3×10^4 . Mediante la adición de Alamar Blue sobre el medio de cultivo se determina, por absorbancia en el cambio de color de azul a rojo (% AB), el número de células metabólicamente activas y por tanto el crecimiento de las mismas. De esta forma, el gráfico de la figura 2 muestra el crecimiento celular en función del tiempo de ambos recubrimientos, sin tratar y con calor, y de un film obtenido por casting (formado por evaporación de disolvente) a partir de la misma disolución polimérica empleada en el proceso de electroestirado. En dicho gráfico puede observarse que el crecimiento celular se mejora incluso como consecuencia del proceso térmico aplicado. Esto puede deberse a que se produce una ligera disminución del tamaño fibrilar y también a la aparición de nanoporos que podrían favorecer el anclaje celular. De esta forma, se presenta una mejora en la bioactividad establecida con respecto al mismo material en forma de film de superficie plana.

Ejemplo 2

El siguiente ejemplo se refiere a la obtención de un recubrimiento similar pero, en este caso, obtenido para una proteína y esterilizado por calor seco. Para ello, 33 g de zeína son completamente disueltos en una mezcla de 64 g etanol y 11 g agua. A esta disolución polimérica se añaden 1.5 g de ácido cítrico en presencia de 0.5 g de hipofosfito de sodio monohidratado como agentes entrecruzantes. A continuación, la disolución polimérica anteriormente obtenida es electroestirada en las siguientes condiciones: 12 kV, 0.10 ml/h y 13 cm. Posteriormente, las fibras son recogidas en un colector metálico y son introducidas en un horno a 180°C durante 30 min para su completa esterilización. Las imágenes de la figura 3 muestran las fibras de zeína, antes y después del tratamiento térmico tomadas por un microscopio de barrido electrónico. Al igual que en el ejemplo anterior, se muestra cómo los recubrimientos siguen manteniendo su estructura submicro-métrica fibrilar. No obstante, en la estructura tratada térmicamente se observa un proceso de entrecruzamiento mediante el cual las fibras su-

fren un cierto ensanchamiento y forman un entramado mucho más compacto. A consecuencia de esta nueva estructura, las fibras de zeína poseen una optimizada resistencia al agua y mejores propiedades físicas. Ensayos de bioactividad con los osteoblastos, según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, son realizados en ambas muestras y un film de zeína obtenido por casting a partir de la misma disolución polimérica. En la gráfica de la figura 4 se muestran los resultados del crecimiento celular, mostrando que existe un ligero descenso del crecimiento en los primeros días tras el proceso térmico, muy posiblemente debido al mayor tamaño de las fibras. No obstante, la mejora en la bioactividad respecto al film sigue siendo muy considerable.

Ejemplo 3

Se presenta la descripción de la obtención de un recubrimiento de fibras electroestiradas de un poliéster adheridas a una resina acrílica. Inicialmente, 5 g de ácido poliglicólico (PGA) son completamente disueltos en 95 g de hexafluoruro de propanol. A continuación, la disolución polimérica anteriormente obtenida es electroestirada sobre una resina acrílica precurada a 100°C durante 30 min. El proceso de electroestirado se realiza en las siguientes condiciones: 9 kV, 0.20 ml/h y 12 cm. Posteriormente, la resina recubierta superficialmente con las fibras electroestiradas es introducida en un horno a 150°C durante 2 h. La imagen de la figura 5 muestra la resina acrílica antes y después de ser recubierta con las fibras de PGA después de la fijación con temperatura. En la figura 6 se muestra en detalle, por microscopio de barrido electrónico, la morfología de la superficie de la resina acrílica con las fibras de PGA que se encuentran recubriéndola. Como se puede observar visualmente, el material compuesto resultante posee una superficie basada en fibras electroestiradas, que simulan la morfología real de tejidos vivos. La bioactividad de la superficie, combinada con la rigidez de la resina, otorga a este material unas propiedades idóneas para su uso como elemento de implante. Finalmente, para comprobar la mejora en la bioactividad, mediante un ensayo *in vitro* de viabilidad celular se pudo determinar la viabilidad celular. Para ello, osteoblastos (células óseas) de la línea celular *MG-63* en medio *Eagle* enriquecido con nutrientes son añadidos a los recubrimientos en una concentración de 3×10^4 . Mediante la adición de Alamar Blue sobre el medio de cultivo se determina, de acuerdo a lo descrito en el ejemplo 1, el número de células metabólicamente activas y por tanto el crecimiento de las mismas. De esta forma el gráfico de la figura 7 muestra el crecimiento celular en función del tiempo de la resina acrílica recubierta

con fibras electroestiradas de PGA. Este crecimiento es comparado con el obtenido en la misma resina acrílica sin recubrir y con el del mismo recubrimiento de fibras de PGA pero sobre un soporte inerte (papel de aluminio). En dicho gráfico puede observarse que el crecimiento celular se mejora ampliamente al recubrir la resina con las fibras electroestiradas. De hecho, si se compara el crecimiento entre el recubrimiento sobre la resina con el obtenido sobre un soporte inerte se puede observar un descenso, muy posiblemente debido a la baja biocompatibilidad de la resina que podría asociar una ligera citotoxicidad. De esta forma, se presenta un proceso capaz de generar un implante permanente biocompatible basado en una interfase-matriz plástica con una bioactividad mejorada.

Ejemplo 4

Se presenta la descripción de la obtención de un recubrimiento de fibras electroestiradas de un poliéster adheridas sobre un termoplástico. La disolución polimérica obtenida en el ejemplo 3 se electroestira en las mismas condiciones sobre un film de ácido poliláctico (PLA) previamente obtenido por casting (formación mediante evaporación del disolvente). Posteriormente, el film de PLA recubierto superficialmente con las fibras electroestiradas es introducido en un horno a 110°C durante 30 minutos. La imagen de la figura 8 muestra el film de PLA antes y después del proceso de electroestirado más el calentamiento. Del mismo modo, para comprobar la mejora en la bioactividad, mediante un ensayo *in vitro* de viabilidad celular se determinó la capacidad celular con osteoblastos mediante el método de Alamar Blue descrito en el ejemplo 1. Así el gráfico de la figura 9 muestra el crecimiento celular en función del tiempo del film de PLA recubierto con fibras electroestiradas de PGA. Este crecimiento fue comparado con el obtenido en otro film sin recubrir de PLA obtenido en las mismas condiciones y con el del mismo recubrimiento de fibras de PGA sobre un soporte inerte (papel de aluminio). En dicho gráfico puede observarse que el crecimiento celular se mejora ampliamente tras recubrir el film de PLA con las fibras electroestiradas de PGA. Esto se debe a que la superficie del film es completamente lisa con lo cual la bioactividad no se ve incrementada a diferencia de las fibras electroestiradas que simulan la morfología real de los tejidos vivos. Sin embargo, dado que el PLA es completamente biocompatible y no asocia citotoxicidad, el crecimiento entre el recubrimiento sobre PLA con el obtenido sobre un soporte inerte es prácticamente el mismo. De esta forma, se presenta un proceso capaz de generar un implante temporal biocompatible y con una bioactividad mejorada.

REIVINDICACIONES

1. Composición bioactiva obtenida por un procedimiento de electroestirado que comprende al menos un polímero que se selecciona entre poliésteres, policetonas, proteínas estables térmicamente, polisacáridos o cualquiera de sus mezclas.

2. Composición bioactiva según la reivindicación 1 donde los poliésteres se seleccionan de una lista que comprende: ácido poliglicólico (PGA), ácido poli(glicólico-co-láctico) (PGLA) y ácido poli-L-láctico (PLLA), polihidroxialcanoatos y policaprolactonas (PCL).

3. Composición bioactiva según la reivindicación 1 donde las policetonas se seleccionan de una lista que comprende: poliéter éter cetona (PEEK) y poliéter éter cetona sulfonado (S-PEEK).

4. Composición bioactiva según la reivindicación 1 donde las proteínas se seleccionan de una lista que comprende: zeína, proteína de soja y cualquiera de sus combinaciones.

5. Composición bioactiva según la reivindicación 1 donde los polisacáridos se seleccionan de una lista que comprende: celulosa, quitosano o cualquiera de sus combinaciones.

6. Composición bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que además comprende un material biocerámico.

7. Composición bioactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que además comprende un fármaco.

8. Composición bioactiva según la reivindicación 7 donde el fármaco se selecciona de la lista que comprende: antiinflamatorio, antibiótico, analgésico o cualquiera de sus combinaciones.

9. Procedimiento de obtención de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende las siguientes etapas:

- a. Homogenización de una composición precursora que comprende un polímero que se selecciona entre un poliéster, una policetona, una proteína estable térmicamente, un polisacárido o cualquiera de sus mezclas, y al menos un disolvente;
- b. electroestirado estático o dinámico de la composición obtenida en la etapa (a) aplicando una diferencia de potencial entre el capilar que contiene la composición y el colector sobre el que se deposita,
- c. Esterilización de la composición obtenida en la etapa (b).

10. Procedimiento según la reivindicación 9 donde se adiciona, durante la etapa (a), al menos un material biocerámico, un fármaco o ambos.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 donde se realiza al menos un post-tratamiento que puede ser después de la etapa (a), después de la etapa (b) o después de la etapa (c).

12. Procedimiento según la reivindicación 11 donde el post-tratamiento comprende un proceso de entrecruzamiento y/o lavado.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 donde la homogenización de la etapa (a) se realiza por agitación mecánica.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 donde el electroestirado de la etapa

(b) se realiza a una distancia entre el capilar y el soporte de entre 1 y 200 cm.

15. Procedimiento según la reivindicación 14 donde el electroestirado de la etapa (b) se realiza a una distancia entre el capilar y el soporte de entre 5 y 50 cm.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 donde el electroestirado de la etapa (b) se realiza a velocidad de deposición entre 0,001 y 100 ml/h.

17. Procedimiento según la reivindicación 16 donde el electroestirado de la etapa (b) se realiza a velocidad de deposición entre 0,01 y 10 ml/h.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17 donde el electroestirado de la etapa (b) se realiza aplicando un voltaje entre 1 y 100 kV.

19. Procedimiento según la reivindicación 18 donde el electroestirado de la etapa (b) se realiza aplicando un voltaje entre 5 y 25 kV.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 19 donde el tratamiento de esterilización de la etapa (c) se realiza por aplicación de calor húmedo o seco.

21. Procedimiento según la reivindicación 20 donde la aplicación de calor húmedo se realiza en autoclave a una temperatura entre 60 y 200°C durante un tiempo de al menos 15 min.

22. Procedimiento según la reivindicación 21 donde la aplicación de calor húmedo se realiza en autoclave a una temperatura entre 100 y 135°C.

23. Procedimiento según la reivindicación 20 donde el método seco se realiza en un horno a una temperatura entre 100 y 300°C durante un tiempo de 1 minuto a 4 h.

24. Uso de la composición electroestirada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en aplicaciones biomédicas.

25. Uso de la composición electroestirada según la reivindicación 24 donde la aplicación biomédica se selecciona de una lista que comprende la fabricación de prótesis e implantes, el recubrimiento de implantes, fabricación de suturas, sustitución directa de tejidos y sistemas de liberación controlada de fármacos.

26. Material que comprende una matriz plástica recubierta por una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

27. Material según la reivindicación 26, donde la matriz plástica comprende un polímero termoestable, un polímero elastomérico o un polímero termoplástico.

28. Material según la reivindicación 27, donde la matriz plástica es un polímero termoestable o elastomérico que se selecciona de la lista que comprende resinas acrílicas, resinas epoxi, poliuretanos, poliésteres insaturados, policetonas, resinas polifenólicas, poliimidas, poliuretanos, siliconas, cauchos, gomas naturales o cualquiera de sus combinaciones.

29. Material según la reivindicación 28, donde el polímero termoestable o elastomérico está curado, sin curar o pre-curado.

30. Material según la reivindicación 27, donde la matriz plástica es un polímero termoplástico que se selecciona de la lista que comprende poliésteres, polioles, policetonas, poliamidas biodegradables, polisacáridos, proteínas y poliolefinas.

31. Material según la reivindicación 30, donde el polímero termoplástico es un poliéster que se selecciona de la lista que comprende ácido poliláctico

(PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli(hidroxialcanoatos) (PHAs), policaprolactonas (PCL) poli(hidroxialcanoatos) (PHAs) o cualquiera de sus combinaciones.

32. Material según la reivindicación 30, donde el polímero termoplástico es un poliol que se seleccionan de la lista que comprende polisacáridos, polialcohol de vinilo (PVOH), sus copolímeros con etileno (EVOH) o cualquiera de sus combinaciones.

33. Procedimiento de obtención del material según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, que comprende:

- a. recubrir una matriz plástica con la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,
- b. realizar un tratamiento térmico de adhesión de la composición sobre la matriz.

34. Procedimiento según la reivindicación 33,

donde el recubrimiento de la etapa (a) se lleva a cabo de forma simultánea con un proceso de electroestirado.

35. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 33 ó 34 donde el tratamiento térmico de adhesión, cuando la matriz plástica es un polímero termoestable, es un proceso de curado o post-curado.

36. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 33 ó 34 donde el tratamiento térmico de adhesión, cuando la matriz plástica es un polímero termoplástico, se realiza a temperaturas en las que el polímero esta plastificado.

37. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36 que además comprende una etapa de esterilización posterior a la etapa (b).

38. Uso del material según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32 como implante biocompatible permanente o reabsorbible.

Fig. 1

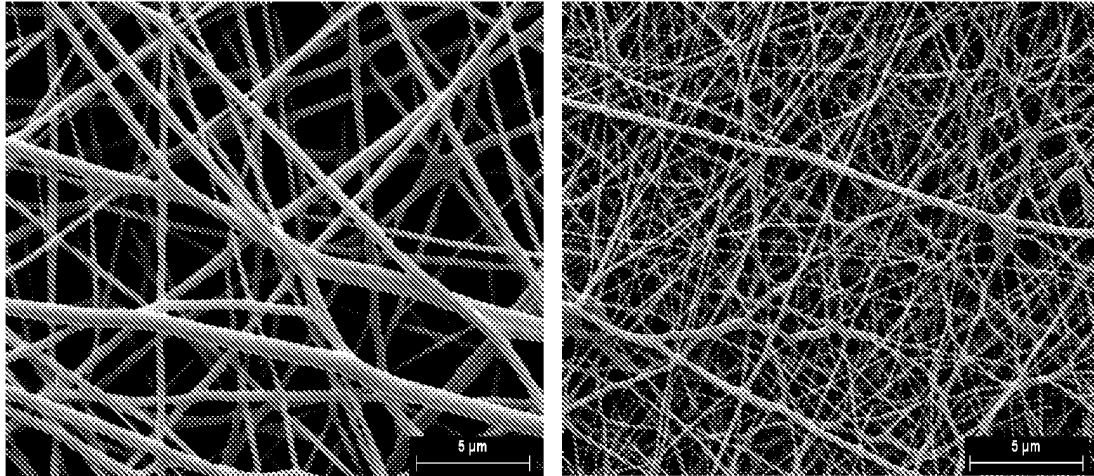


Fig. 2

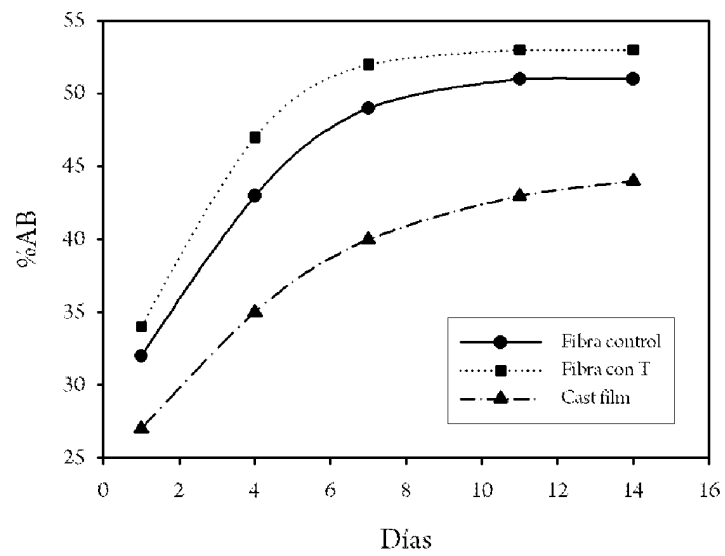


Fig. 3

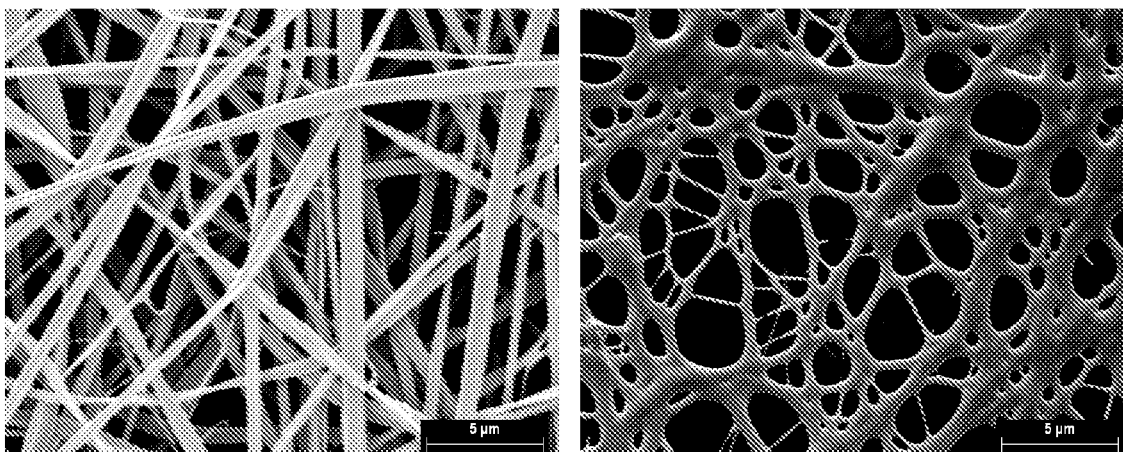


Fig. 4

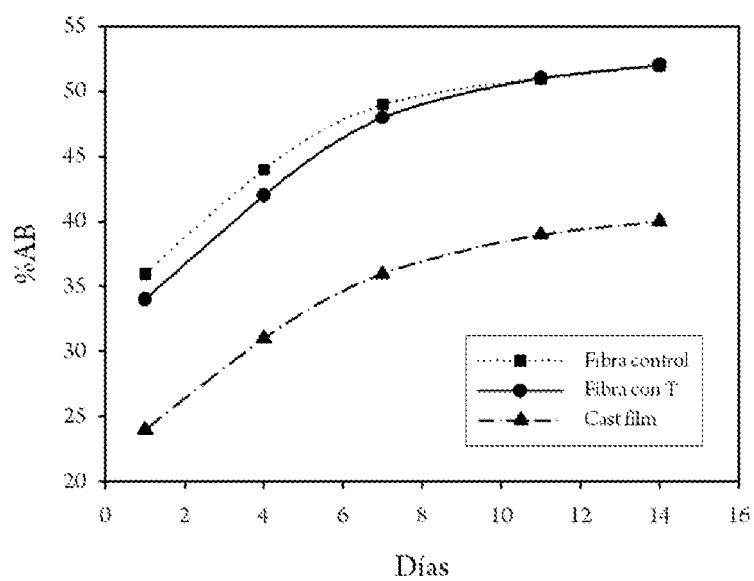


Fig. 5

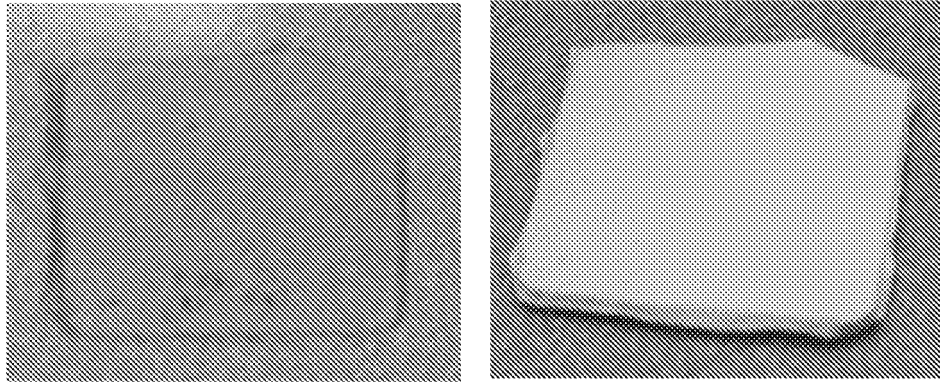


Fig. 6

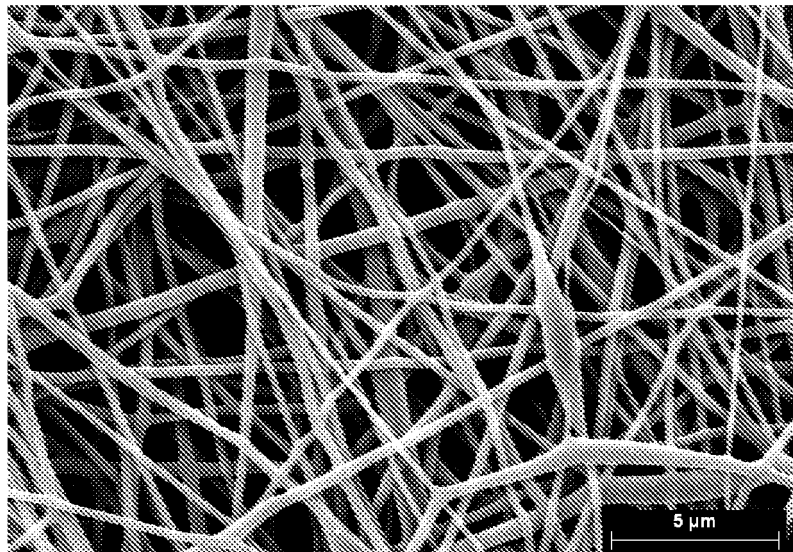


Fig. 7

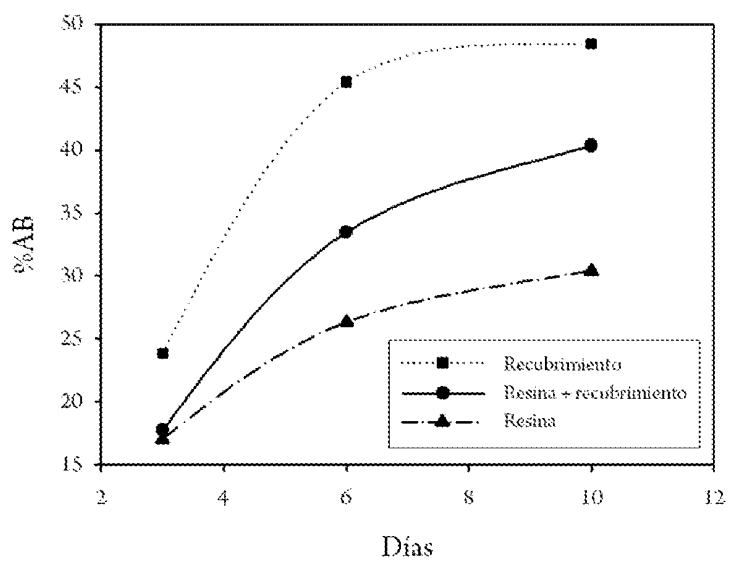


Fig. 8

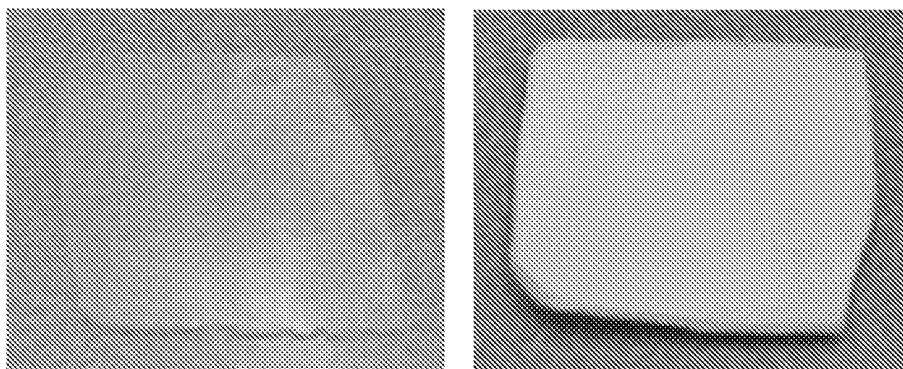
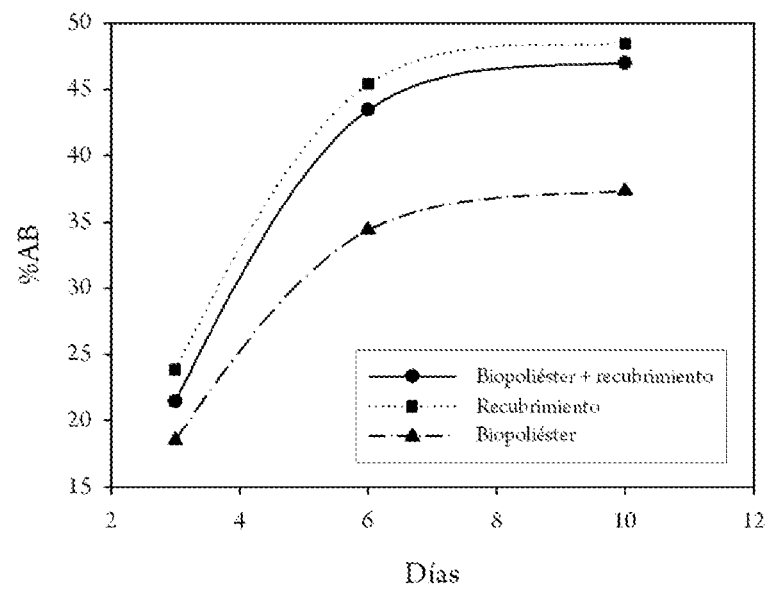


Fig. 9





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931034

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.11.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	W. LI et al., "Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxyester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications", Acta Biomaterialia, 2006, vol. 2, páginas 377-385.	1,2,9,13-19,24,25
X	S. TORRES-GINER et al., "Novel antimicrobial ultrathin structures of zein/chitosan blends obtained by electrospinning", Carbohydrate Polymers, 2009 [accesible en línea el 14.01.2009], vol. 77, páginas 261-266.	1,4,5,9,13-23
X	WO 2008157594 A2 (NEW JERSEY INST. TECHNOL.) 24.12.2008, párrafos [0014],[0015],[0017],[0063],[0064],[0067]; reivindicaciones 1-3,11-13,26.	1,2,6,9,10,13-19,24,25
X	E. KENAWY et al., "Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems", Materials Chem. Phys., 2009 [publicado el 15.01.2009], vol. 113, páginas 296-302.	1,2,7,8-10,13-19
X	WO 2005047493 A2 (MICHIGAN STATE UNIVERSITY) 26.05.2005, página 4, línea 28 – página 5, línea 12; página 6, línea 24 – página 7, línea 26; página 18, líneas 9-33; página 22, línea 15 – página 23, línea 2; página 30, líneas 15-28; reivindicaciones 1,7-10,31-36,39-43,60-61.	1,2,7,9,10,24-38
X	WO 2009065983 A1 (NANOBIOMATTER) 28.05.2009, página 6, líneas 24-34; página 7, líneas 1-16; página 8, línea 35; página 10, líneas 11-33; página 11, líneas 1-10,18-34; ejemplos 1,2; reivindicaciones 7,13-15,31.	26-38
A	S. AGARWAL et al., "Use of electrospinning technique for biomedical applications", Polymer, 2008, vol. 49, páginas 5603-5621.	1-38

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
17.03.2011

Examinador
E. Davila Muro

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

D01F9/00 (2006.01)

D01D5/10 (2006.01)

C12N5/02 (2006.01)

A61L27/34 (2006.01)

A61L27/50 (2006.01)

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

D01F, D01D, C12N, 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, WPI, XPESP, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3,11,12,21-23	SI
	Reivindicaciones 1,2,4-10,13-19,24-38	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-38	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	W. LI et al., Acta Biomaterialia, 2006, vol. 2, páginas 377-385.	
D02	S. TORRES-GINER et al., Carbohydrate Polymers, 2009, vol. 77, páginas 261-266.	
D03	WO 2008157594 A2 (NEW JERSEY INST. TECHNOL.)	24.12.2008
D04	E. KENAWY et al., Materials Chem. Phys., vol. 113, páginas 296-302.	
D05	WO 2005047493 A2 (MICHIGAN STATE UNIVERSITY)	26.05.2005
D06	WO 2009065983 A1 (NANOBIOMATTER)	28.05.2009

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

El objeto de la invención es una composición bioactiva obtenida por electroestirado que comprende un polímero seleccionado entre poliésteres (ácido poliglicólico, ácido poli(glicólico-co-láctico), ácido poli-L-láctico, polihidroxialcanoatos, policaprolactona), policetonas (poliéster cetona, poliéster cetona sulfonado), proteínas estables térmicamente (zeína, proteína de soja) o polisacáridos (celulosa, quitosano). La composición puede comprender además un material biocerámico o un fármaco. La invención también se refiere al procedimiento de obtención de la composición mediante técnicas de electroestirado en unas condiciones determinadas, al uso de la misma en aplicaciones biomédicas (prótesis e implantes, recubrimiento de implantes, suturas, sustitución de tejidos, sistemas de liberación controlada de fármacos), al material obtenido por recubrimiento de una matriz plástica con la composición, al procedimiento de obtención de dicho material y al uso del mismo como implante biocompatible.

El documento D01 divulga la preparación y caracterización de entramados de fibras poliméricas a base de poli(α -hidroxi)ésteres (PGA, PLLA, PDLLA, PGLA, PCL) obtenidos mediante electroestirado y que tienen aplicación en ingeniería de tejidos. El proceso se lleva a cabo preparando una disolución homogénea del polímero en un disolvente orgánico (propanol, THF, DMF) que se somete a electroestirado aplicando una diferencia de potencial de 10-16 kV y con una distancia entre el capilar y el soporte de 20 cm (ver páginas 378-379).

El documento D02 divulga unas estructuras ultrafinas antimicrobianas a base de mezclas de zeína/quitosano obtenidas mediante electroestirado. Se preparan las disoluciones homogéneas de zeína/quitosano en distintas proporciones y se lleva a cabo el proceso de electroestirado a una concentración de polímero en la disolución del 25%, una velocidad de deposición de 0,20 ml/h, un voltaje de 14 kV y una distancia entre el capilar y el soporte de 10 cm. Las estructuras fibrosas así obtenidas tienen aplicación como recubrimientos antimicrobianos en envasado de alimentos y en aplicaciones biomédicas (ingeniería de tejidos, implantes médicos).

El documento D03 divulga composiciones para preparar matrices tridimensionales de fibras poliméricas micrométricas mediante electroestirado. Las composiciones están integradas por un componente polimérico (PGA, PLLA, PGLA, PCL, poliorotésteres, poliamidas, polisacáridos, colágeno), y un componente cerámico bioactivo (hidroxiapatita, fosfato tricálcico) (ver páginas 6-8, reivindicaciones 1-3,7,11-13,26). El proceso de electroestirado se realiza a partir de una disolución homogénea del polímero y el componente biocerámico, aplicando un voltaje de 17 kV y con una distancia de 15 cm entre el capilar y el soporte (ver páginas 19-20). Estas composiciones tienen aplicación en procesos de regeneración de tejidos óseos.

El documento D04 divulga un proceso para preparación de nanofibras poliméricas mediante electroestirado a partir de una composición que comprende PCL y/o PU y ketoprofeno. Estas nanofibras tienen aplicación en sistemas de liberación controlada de fármacos. El proceso de electroestirado de las mezclas PCL-ketoprofeno se realiza a una velocidad de deposición de 6-7 ml/h, un voltaje aplicado de 20 kV y una distancia de 15 cm (ver página 298, apartado 3.1.2.).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1, 9 y 24, así como las dependientes 2, 4-8, 10, 13-20 y 25 no presentan novedad ni actividad inventiva con respecto a lo divulgado en los documentos D01-D04 (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).

El documento D05 divulga unas estructuras en forma de nanofibras que se utilizan para cultivo e ingeniería de tejidos (recubrimiento de implantes, fabricación de suturas, crecimiento y sustitución de tejidos). Se obtienen a partir de composiciones que comprenden un poliéster (PGA, PLLA, PCL) o poliamida y una o varias moléculas bioactivas (lípidos, carbohidratos, polisacáridos, aminoácidos, nucleótidos, factores de crecimiento, factores de diferenciación, proteínas

fibrosas). Las nanofibras se forman mediante electroestirado de la composición sobre un sustrato de vidrio o plástico (p. ej. una lámina de polivinil alcohol) utilizando una disolución de 15% en peso del poliéster y una molécula bioactiva en cloroformo y aplicando un voltaje de 18 kV a una distancia entre el capilar y el soporte de 5 cm (ver reivindicaciones 1,7-10,31-36,39-43,60-62 y ejemplos).

El documento D06 divulga un procedimiento para la fabricación de nuevos materiales y envases con propiedades mejoradas que incorporan polímeros obtenidos por técnicas de electroestirado a matrices plásticas. Los polímeros pueden ser poliésteres (PLL, PGA, PCL, polihidroxialcanoatos), polisacáridos (quitosano, quitina, celulosa), proteínas (zeína, fibroína de seda, soja, glúten, colágeno) o lípidos con o sin otros aditivos. El proceso supone disolver uno o varios polímeros a los que se puede añadir sustancias bioactivas o materiales cerámicos y someter la disolución a electroestirado aplicando un voltaje de 0-30 kV, un flujo de bombeo de 0,01-5 mL/h y una distancia al colector de 1-25 cm. Este proceso de electroestirado se puede realizar de forma directa sobre una superficie plástica de objetos preconformados o conformados mediante técnicas de laminación o recubrimiento y/o por mezclado en fundido (ver páginas 6-7,10-11,13, ejemplos). Los materiales y envases obtenidos pueden utilizarse en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (ver reivindicación 31).

En consecuencia, el objeto de las reivindicaciones 26,33 y 38, así como las dependientes 27-32 y 34-37 se considera que no presentan novedad ni actividad inventiva con respecto a lo divulgado en los documentos D05 y D06 (Art. 6.1 y 8.1 LP11/1986).