

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 183**

21 Número de solicitud: 201431091

51 Int. Cl.:

C01B 25/32 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

A61L 27/00 (2006.01)

A61C 13/00 (2006.01)

A61B 6/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

21.07.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.01.2016

Fecha de la concesión:

26.10.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

03.11.2016

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES y
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**DELGADO LÓPEZ, José Manuel;
GÓMEZ MORALES, Jaime;
FERNÁNDEZ PENAS, Raquel;
IAFISCO, Michele;
TAMPIERI, Anna y
PANSERI, Silvia**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor.

Este material presenta aplicaciones en biomedicina por su excelente biodegradabilidad y bioactividad; además promueve la adhesión celular y osteogeneración. En odontología, puede utilizarse en pastas dentales, enjuagues bucales, goma de mascar, geles y barnices de flúor como agente remineralizante de dentina y esmalte.

Parte de dos disoluciones formadas por cloruro cálcico y citrato sódico por un lado, y por monohidrogenofosfato sódico y carbonato sódico con un compuesto de flúor, que se mezclan a temperatura ambiente. El procedimiento es ecoeficiente ya que no deja ningún residuo ácido; consta de una sola etapa y es la primera vez que se obtiene un fosfato cálcico amorfo recubierto con citrato y dopado con flúor lo que potencia su acción remineralizante.

ES 2 557 183 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor.

5

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

Biomateriales de interés en biomedicina (transportador de fármacos y regeneración ósea) y odontología.

10

El objeto de la invención es un procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato (molécula que forma parte de la fase orgánica del hueso) y dopadas con flúor. Este material presenta un amplio rango de aplicaciones en el campo de la biomedicina (transportador de fármacos y regeneración ósea) debido a su excelente biodegradabilidad y bioactividad, además de promover la adhesión celular y la osteogeneración. Asimismo, presenta múltiples aplicaciones en odontología donde puede ser utilizado en pastas dentales, enjuagues bucales, barnices de flúor, goma de mascar y geles como agente remineralizante de la dentina y el esmalte.

15

20

El procedimiento parte de dos disoluciones formadas por cloruro cálcico y citrato sódico por un lado, y por monohidrogenofosfato sódico y carbonato sódico con un compuesto de flúor, que se mezclan a temperatura ambiente. Presenta las ventajas, frente al estado de la técnica anterior, de que el procedimiento es ecoeficiente ya que no deja ningún residuo ácido (no se utilizan ácidos fuertes en la síntesis), de sintetizarse en una sola etapa (al utilizar el citrato sódico como reactivo en la síntesis) y de ser la primera vez que se obtiene un fosfato cálcico amorfo recubierto con citrato y dopado con flúor, por tanto con una acción remineralizante más potente que el fosfato cálcico amorfo.

25

ESTADO DE LA TECNICA

30

La fase amorfa es una forma poco frecuente de encontrar el fosfato de calcio (CaP) mineral en organismos vivos. El fosfato de calcio amorfo (ACP) se ha encontrado en las mitocondrias de células eucariotas y procariontas y se considera la fase precursora en el proceso de formación de la fase mineral del hueso, carbonato-apatito nanocristalino, cuya superficie se ha encontrado recientemente que se halla recubierta de citrato. El ACP también actúa como fase intermedia en la preparación de diversos CaP mediante distintos métodos. Este material presenta un amplio rango de aplicaciones en el campo de la biomedicina debido a sus interesantes propiedades tales como excelente bioactividad, facilita la adhesión celular, fácil biodegradación y además favorece la osteoconductividad y osteogeneración. Asimismo, presenta múltiples aplicaciones en odontología donde puede ser utilizado en pastas dentales, enjuagues bucales, goma de mascar, geles y barnices de flúor como agente remineralizante de la dentina y del esmalte. Los barnices de flúor son actualmente los productos remineralizantes más usados por los odontólogos en Europa.

35

40

45

Se conoce por el documento WO98/40406 un producto que está compuesto de fosfato de calcio amorfo estabilizado con caseína, una fosfoproteína presente en la leche. Este producto se está usando actualmente como material abrasivo en pastas dentífricas, gomas de mascar y en post-tratamientos de blanqueamiento dental. Sin embargo, su eficacia para prevenir caries y remineralizar el esmalte dañado no se ha demostrado todavía. El ACP también se está usando en materiales poliméricos compuestos como material de relleno para la reparación de piezas dentales. El ACP estimula la reparación del diente debido a que especialmente a los pHs ácidos generados por la placa bacteriana se produce la liberación de iones Ca y fosfato que se depositan sobre la estructura del diente como hidroxapatito regenerando el esmalte

50

(principalmente compuesto de hidroxiapatito cristalino). La tabla 1 resume las principales aplicaciones del ACP como biomaterial.

Tabla1. Fosfatos de calcio amorfo usados como biomateriales.

5

Tipo de material	Aplicación	Efecto
Cementos	Sustitución ósea Odontología	Agente endurecedor Absorbible con gran reactividad superficial. Fuente de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-}
Recubrimientos	Prótesis metálicas	Aumenta la biodegradabilidad y su actividad biológica
Compuestos mineral/orgánico	Remineralización de dientes Sustitución ósea	Mejora sus propiedades mecánicas Liberación de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} aumentando su actividad biológica
Suspensión acuosa	Liberación de genes	Absorbible y biocompatible. Estabilidad dependiente del pH

Algunas de estas aplicaciones han sido recopiladas en J. Zhao y col. *Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry*; Chemistry Central Journal (2011), 5:40 (doi:10.1186/1752-153X-5-40).

10 En cuanto a la preparación del ACP, es conocida en diversas modalidades partiendo de precursores solubles de Ca^{2+} y PO_4^{3-} a pHs adecuados para la precipitación, siendo común la utilización de precursores solubles cuyo catión no conduzca a otras especies que pudieran interferir a posteriori en la composición del producto final, como pudieran ser el $\text{Ca}(\text{OH})_2$, el H_3PO_4 , el fosfato o hidrogenofosfato amónico. Se utiliza frecuentemente $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

15 También es conocida la función del ácido cítrico como complejante del catión Ca^{2+} que además es aceptable desde el punto de vista farmacéutico, como así lo son, por ejemplo, otros ácidos policarboxílicos como el ácido tartárico. Por este motivo estos ácidos se utilizan también para estabilizar composiciones amorfas de ACP. Así se recoge en las reivindicaciones de la publicación WO03059304 donde se propone el ácido cítrico, entre otros formadores de quelatos con el catión Ca^{2+} , en una proporción del 0,1 % al 5% en peso en un preparado que contiene ACP combinado con un fosfopéptido.

20 En JP2001169121, se propone la utilización de ácido cítrico como estabilizante del ACP ya formado por precipitación desde el ácido fosfórico y el hidróxido de calcio, sometiendo el conjunto a una molienda posterior en presencia del ácido cítrico referido.

25 Por tanto, ninguna de estas publicaciones menciona una preparación como la del procedimiento objeto de la presente invención, en la que el citrato se aporta como reactivo para la precipitación del ACP (proceso en una etapa) y no como estabilizante en una fase posterior a la precipitación (proceso en dos etapas).

30 En las revisiones de Dorozhkin S. V. [*Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates*, Acta Biomaterialia (2010), No. 6 (3), 715-734]; Combes C. y Rey C. [*Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials*, Acta Biomaterialia (2010), No.6 (9), 3362-3378] y otra revisión de Dorozhkin S. V. [*Amorphous calcium phosphates*, Acta Biomaterialia (2010), No.6 (12), 4457-4475 se recogen diversos procedimientos por vía

húmeda, pero en los que no se aplican las mismas condiciones, etapas de proceso y reactivos que en el procedimiento objeto de la presente invención. De hecho, se contempla el ácido cítrico en numerosas ocasiones como agente dispersante en estas preparaciones y ocasionalmente el anión carbonato con funciones similares.

5

La publicación de J.M. Delgado-López et al. *Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content* (Acta Biomaterialia (2012) No.8, pág. 3491) establece un procedimiento de precipitación de apatito y carbonato-apatito nanocristalino recubierto con citrato. Las diferencias sustanciales en el estado de la técnica entre el

10

(1) Temperatura de la precipitación

(2) Precipitación de nanopartículas de ACP dopadas con flúor y recubiertas con citrato como fase estable.

15

(3) No existe proceso de maduración del precipitado

(4) No se forma apatito ni ninguna otra fase cristalina del fosfato de calcio en el precipitado.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

20 Constituye un primer objeto de la presente invención un procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor (FACP) que comprende:

25 - preparación de una disolución de CaCl_2 a una concentración comprendida entre 0,08 M y 0,12 M y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (citrato sódico) a concentración comprendida entre 0,35 M y 0,50 M.

- preparación de una segunda disolución formada por Na_2HPO_4 a concentración comprendida entre 0,10 M y 0,15 M con Na_2CO_3 0.2 M y un compuesto de flúor.

30 - mezcla bajo agitación de las dos disoluciones preparadas en las etapas anteriores en proporción 1:1 v/v a pH comprendido entre 8,3 y 8,7 (ajustado por ejemplo con HCl) y a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo inferior a 2 minutos.

- tres ciclos sucesivos de sedimentación por centrifugación, eliminación del sobrenadante y lavados del precipitado con agua ultrapura.

- liofilización del precipitado húmedo.

35 En un modo preferente de realización de la invención, las concentraciones de los reactivos utilizados para la primera disolución son 0,1 M para el CaCl_2 y 0,4 M para el $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ y las concentraciones utilizadas para la segunda disolución son 0,12 M para el Na_2HPO_4 y 0,2 M para el Na_2CO_3 .

40 El compuesto de flúor se selecciona entre CaF_2 , NaF ó KF y se añade a una concentración comprendida entre 0,01 M y 0,1 M. En un modo de realización preferente, el compuesto de flúor es CaF_2 y se añade a una concentración de 0,05 M.

45 Constituye otro objeto de la presente invención nanopartículas de fosfato cálcico amorfo dopadas con flúor, obtenidas mediante el procedimiento anterior, que presentan forma esférica y tamaño comprendido entre 30 y 80 nm, así como los siguientes contenidos de Na, Ca, P, citrato, carbonato, fluoruro y agua estructural:

- 50
- entre 3,1 y 3,5 % en peso de Na
 - entre 27,0 y 27,4 % en peso de Ca
 - entre 37,0 y 37,8 % en peso de P
 - entre 3,5 y 5,0 % en peso de citrato
 - entre 5,4 y 7,0 % en peso de carbonato
 - entre 6 y 10 % en peso de agua

- entre 2 y 5 % en peso de fluoruro

El término "agua" hace referencia en este aspecto de la presente invención tanto al agua adsorbida como al agua estructural.

5 En un tercer aspecto, constituye otro objeto de la presente invención el uso de las nanopartículas en aplicaciones tales como:

- 10 - transporte de biomoléculas y/o fármacos
- biomateriales en aplicaciones ortopédicas
- en odontología, preferentemente como material para preparar cementos para relleno y/o sellado en endodoncias y reparaciones dentales, o bien como componente de pastas dentífricas, gomas de mascar, enjuagues bucales, barnices de flúor y geles para favorecer la remineralización del esmalte por la liberación gradual de iones calcio, fosfato y flúor.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas de ACP (a) y FACP (b) recubiertas de citrato. También se muestran los patrones de difracción de electrones obtenidos para cada una de las nanopartículas. En los paneles c y d se han representado los espectros de dispersión de energía de rayos X (EDS) de ACP y FACP, respectivamente.

Figura 2. Difractogramas de rayos X (a) y espectros Raman (b) de las nanopartículas.

Figura 3. Ensayos de proliferación celular por MTT de osteoblastos humanos incubados durante 1, 3 y 7 días con nanopartículas de ACP (100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL). *p ≤ 0:05; ***p ≤ 0:001; n =3.

30 MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

Las nanopartículas de ACP se obtuvieron mediante un proceso de precipitación mezclando dos disoluciones que contenían:

- 35 (i) 0,1 M CaCl₂ + 0,4 M Na₃C₆H₅O₇ y
 - (ii) 0,12 M Na₂HPO₄ + 0,2M Na₂CO₃
- en proporción 1:1 v/v, 200 ml en total y ajustando el pH a 8,5 con HCl a temperatura ambiente.

40 Cuando la mezcla toma una apariencia lechosa (aproximadamente a los 30 s después de mezclar), las partículas se someten a tres ciclos sucesivos de sedimentación por centrifugación, eliminación del sobrenadante y lavados del precipitado con agua ultrapura (MilliQ[®], Millipore). Posteriormente, el precipitado húmedo se liofiliza y las partículas son posteriormente caracterizadas.

45 Para obtener estas partículas dopadas con F, se añade CaF₂ 0,05 M a la solución (ii).

Técnicas de caracterización

50 Las nanopartículas se analizaron con un Microscopio Electrónico de Transmisión (STEM Philips CM 20) operado a 80 kV. Este equipo también permitió adquirir los patrones de difracción de electrones de las nanopartículas así como los espectros de dispersión de energía de rayos X (EDS). Para dichas observaciones, las muestras liofilizadas se dispersaron en agua ultrapura y a continuación unas cuantas gotas de esta suspensión se depositaron sobre gradillas convencionales de cobre.

La cantidad de Ca y P se cuantificó mediante espectroscopía de emisión óptica (ICP-OES) usando un espectrómetro Liberty 200 (Varian, Australia). Para ello, las muestras liofilizadas se disolvieron en ácido nítrico ultrapuro concentrado (1 % v/v).

5 El análisis termogravimétrico (TGA) se llevó a cabo con un sistema SDT Q 600 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) bajo un flujo constante de nitrógeno (100 mL.min⁻¹) e incrementando la temperatura hasta los 1200 °C en intervalos de 10 °C.min⁻¹.

10 Los patrones de difracción de rayos X se adquirieron con un difractor X-Pert PRO (PANalytical) equipado con un detector PIXcel operando a 45 kV y 40 mA, con radiación incidente Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Se usaron rendijas variables ("anti-scatter"), con una longitud de irradiación de 10 mm. El rango 2θ se varió desde 5° a 70° con incrementos 2θ de 0,039.

15 Los espectros Raman se obtuvieron con un espectrómetro LabRAMHR (Jobin-Yvon, Horiba, Japón). Este equipo está provisto de un láser de diodo como fuente de excitación ($\lambda=532 \text{ nm}$), y de un detector CCD refrigerado por Peltier (1026 x 256 pixels). Los espectros se obtuvieron con una resolución espectral de 3 cm⁻¹.

20 La cantidad de flúor en las muestras se cuantificó mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X (XRF) usando un espectrómetro PHILIPS Magix Pro (PW-2440). Adicionalmente, el contenido en flúor también se determinó mediante espectrofotometría complejándolo con cloruro de zirconilo y eriocromo cianina R y midiendo la absorbancia del complejo a 570 nm.

25 **Análisis de cultivo celular "in vitro"**

La respuesta biológica de las nanopartículas se evaluó usando líneas celulares de osteoblastos humanos (MG-63, Lonza, Italia). Las células se cultivaron en medio DMEM/F12 (PAA, Austria), que contenía un 10% de suero fetal bovino (FBS) y penicilina-estreptomina (100 U/mL-100µg/mL) a 37 °C y en atmósfera de CO₂ (5%). Posteriormente, las células se separaron de su soporte mediante tripsinización y seguidamente fueron centrifugadas y resuspendidas. El test de exclusión con azul de Tripán se utilizó para contar las células vivas (test de viabilidad celular). Las células se depositaron en placas de 96 pocillos con una densidad de 3,0x10³ células por pocillo. 24 horas después, se añadieron al cultivo celular tres concentraciones diferentes de nanopartículas de ACP recubiertas de citrato (100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) previamente esterilizadas mediante radiación γ de 25 kGy. La incubación de las células se realizó en condiciones estándar (37 °C, 5% CO₂) durante 1, 3 y 7 días. El medio de cultivo fue renovado cada tres días. Todos estos ensayos se realizaron en una cabina de flujo laminar.

40 **Ensayos de citotoxicidad MTT y viabilidad celular**

El método MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol -2-il)-2,5-difeniltetrazolio] se utilizó para determinar el posible efecto tóxico de las nanopartículas. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), cuya concentración puede determinarse colorimétricamente, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

50 Las células, después de estar en contacto con las nanopartículas durante 1, 3 y 7 días, se incubaron en MTT disuelto en PBS (5 mg/mL) en proporción 1:10 durante 2 horas a 37°C. Seguidamente las células se incubaron con 200 µl de dimetilsulfoxido (Sigma) durante 15 min para disolver los cristales de formazan. Se empleó un espectrofotómetro Multiskan FC Microplate (Thermo Scientific) para medir la absorbancia, que es directamente proporcional al

número de células metabólicamente activas, a 570 nm. Se analizaron tres muestras por cada uno de los tiempos estudiados (1, 3 y 7 días).

Resultados

5

Las imágenes de microscopía electrónica (Fig. 1) indican que tanto las muestras no dopadas, ACP (A) como las dopadas, FCAP (B) son nanopartículas esféricas con tamaños comprendidos entre 30 y 80 nm. Además, la ausencia de puntos de difracción en los patrones pone de manifiesto su carácter amorfo. A su vez, los espectros EDS confirman que están compuestas sólo por Ca y P. El pico de F en el espectro de las partículas dopadas que debiera aparecer alrededor de 0,68 KeV no se observa porque posiblemente se encuentra solapado con el pico de oxígeno (0,2 KeV), mucho más intenso. La naturaleza amorfa de las nanopartículas se ha confirmado con los patrones de difracción de polvo (Fig. 2A). La ausencia de picos en los patrones de difracción confirma la naturaleza no cristalina de estos materiales. Los espectros Raman también son típicos de fosfatos de calcio amorfo puesto que el pico principal aparece a 952 cm^{-1} , ligeramente desplazados con respecto al pico principal del hidroxiapatito (959 cm^{-1}). La composición química de los materiales ACP y FACP obtenida mediante TGA, ICP y fluorescencia de Rayos X ya ha sido descrita anteriormente.

10

15

20

25

30

La respuesta biológica de las nanopartículas ha sido estudiada con células de osteoblastos (MG-63). Tres concentraciones distintas de nanopartículas (100, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) se añadieron al medio de cultivo y después de un cierto periodo de incubación (1, 3 ó 7 días) se cuantificó el número de células metabólicamente activas mediante ensayos MTT (Fig. 3). Se observó un aumento en la proliferación celular en todos los casos (incluso para la concentración más alta) al pasar de 1 a 7 días de incubación. Además, para la concentración más baja estudiada, el crecimiento celular es comparable al observado por las células en ausencia de nanopartículas (control). Sin embargo al aumentar la concentración, el crecimiento celular es mucho menos notable que en el control, posiblemente debido a que son concentraciones de nanopartículas excesivamente altas. A pesar de ello, los test de viabilidad y morfología celular (no mostrados) dieron resultados muy similares para todas las concentraciones estudiadas. Estos resultados claramente indican que las nanopartículas son totalmente biocompatibles en contacto con esta línea celular de osteoblastos humanos.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.-** Procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor que comprende:
- preparación de una disolución de CaCl_2 a una concentración comprendida entre 0,08 M y 0,12 M y $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ a concentración comprendida entre 0,35 M y 0,50 M
 - preparación de una segunda disolución formada por Na_2HPO_4 a concentración comprendida entre 0,10 M y 0,15 M con Na_2CO_3 0,2 M y un compuesto de flúor.
- 10 - mezcla bajo agitación de las dos disoluciones preparadas en las etapas anteriores en proporción 1:1 v/v a pH comprendido entre 8,3 y 8,7 a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo inferior a 2 minutos.
- tres ciclos sucesivos de sedimentación por centrifugación, eliminación del sobrenadante y lavados del precipitado con agua ultrapura.
- 15 - liofilización del precipitado húmedo.
- 2.-** Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las concentraciones de los reactivos utilizados para la primera disolución son 0,1 M para el CaCl_2 y 0,4 M para el $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$.
- 20 **3.-** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque las concentraciones utilizadas para la segunda disolución son 0,12 M para el Na_2HPO_4 y 0,2 M para el Na_2CO_3 .
- 25 **4.-** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el compuesto de flúor se selecciona entre CaF_2 , NaF y KF y se añade a una concentración comprendida entre 0,01 M y 0,1 M.
- 30 **5.-** Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el compuesto de flúor es CaF_2 que se añade a una concentración de 0,05 M.
- 6.-** Nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor obtenidas mediante un procedimiento según se define en las reivindicaciones 1 a 5, caracterizadas porque presentan forma esférica y tamaño comprendido entre 30 y 80 nm y unos contenidos de Na, Ca, P, citrato, carbonato, fluoruro y agua comprendidos entre:
- 35
- entre 3,1% y 3,5% en peso de Na
 - entre 27,0 % y 27,4% en peso de Ca
 - entre 37,0% y 37,8% en peso de P
- 40
- entre 3,5% y 5,0% en peso de citrato
 - entre 5,4 % y 7,0% en peso de carbonato
 - entre 6,0% y 10,0% en peso de agua
 - entre 2,0% y 5,0% en peso de fluoruro
- 45 **7.-** Uso de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor, según se definen en la reivindicación 6, como transportadoras de biomoléculas, fármacos o ambos.
- 50 **8.-** Uso de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor, según se definen en la reivindicación 6, como biomateriales en aplicaciones ortopédicas.
- 9.-** Uso de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor, según se definen en la reivindicación 6, para aplicaciones en odontología.

10.- Uso según la reivindicación 9, como material para preparar cementos para relleno, sellado o ambas operaciones en endodoncias y reparaciones dentales.

5 **11.-** Uso según la reivindicación 9, como componente de pastas dentífricas, gomas de mascar, enjuagues bucales, barnices de flúor y geles para favorecer la remineralización del esmalte mediante la liberación gradual de iones calcio, fosfato y flúor.

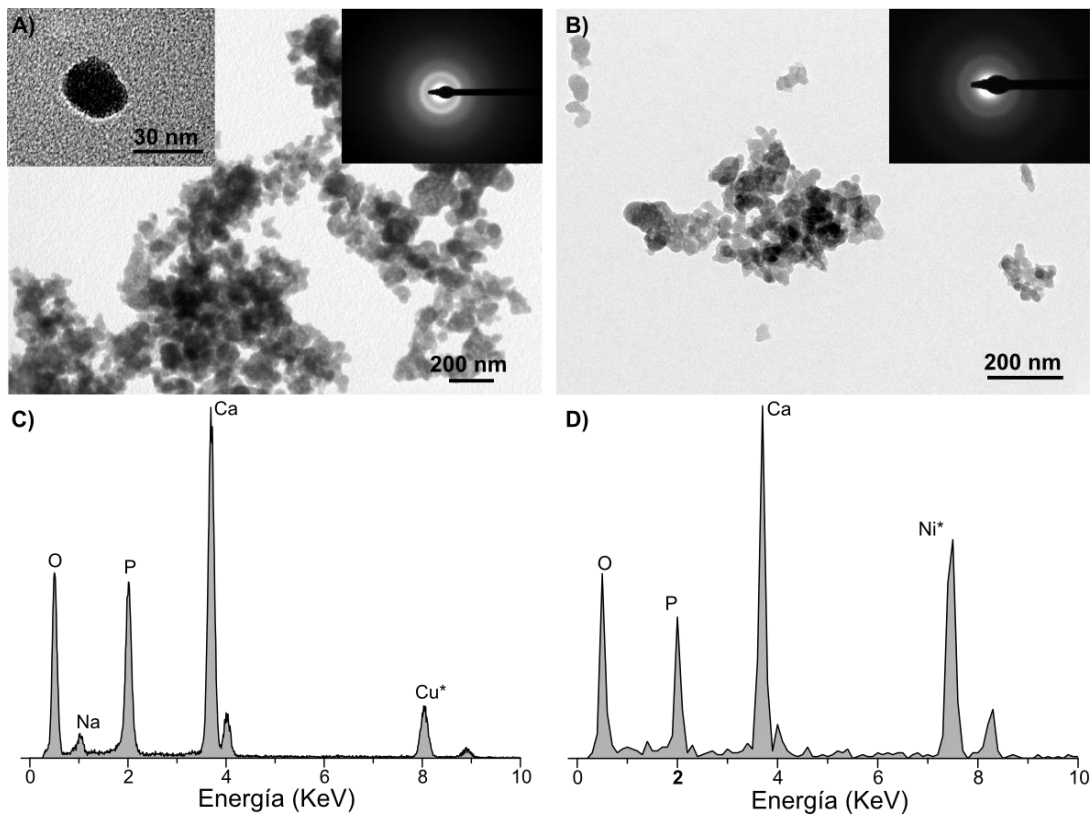


FIG. 1

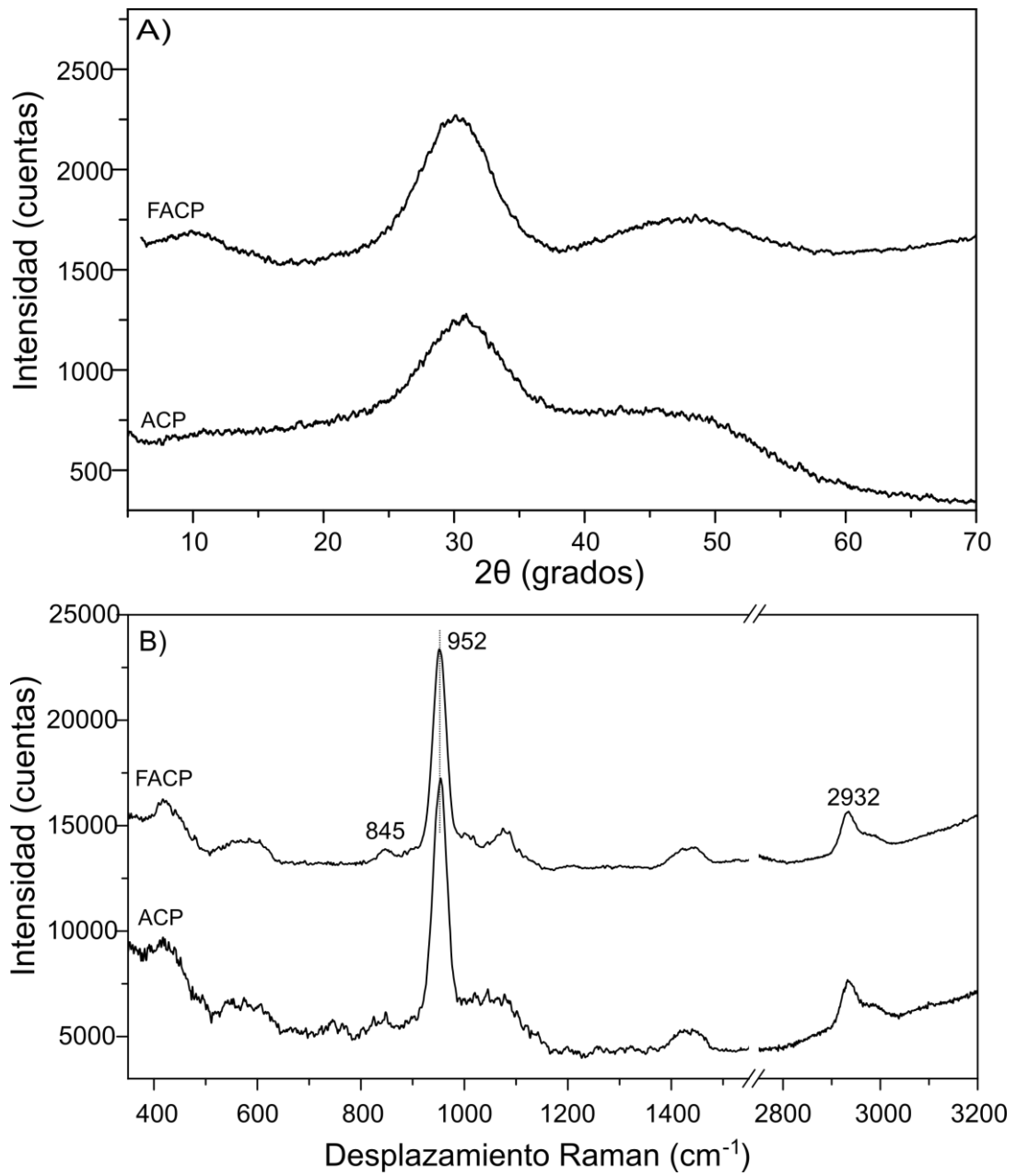


FIG. 2

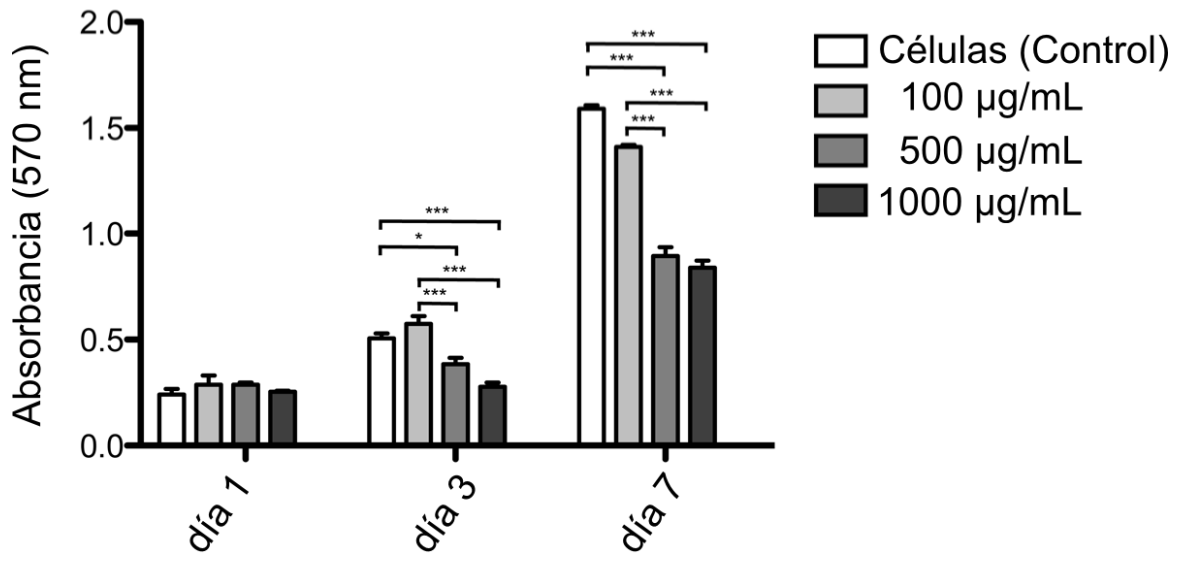


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 201431091
②② Fecha de presentación de la solicitud: 21.07.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MARTINS, Manuel A., et al. Hydroxyapatite micro-and nanoparticles: nucleation and growth mechanisms in the presence of citrate species. Journal of colloid and interface science, 2008, vol. 318, no 2, p. 210-216; apartado 2.2.	1-11
A	WU, Y. J., TSENG, Y. H., & CHAN, J. C.. Morphology control of fluorapatite crystallites by citrate ions. Crystal Growth & Design, 2010, 10(10), 4240-4242; página 4240.	1-11
A	HU, Y.-Y., et al. Biomimetic self-assembling copolymer? hydroxyapatite nanocomposites with the nanocrystal size controlled by citrate. Chemistry of Materials, 2011, vol. 23, nº 9, p. 2481-2490; apartado Nanocomposite Synthesis.	1-11
A	EBRAHIMI-KAHRIZSANGI, Reza; NASIRI-TABRIZI, Bahman; CHAMI, Akbar. Characterization of single-crystal fluorapatite nanoparticles synthesized via mechanochemical method. Particuology, 2011, vol. 9, nº 5, p. 537-544; apartado 3.3, Fig. 5 y Tabla 4.	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
22.12.2015

Examinador
V. Balmaseda Valencia

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C01B25/32 (2006.01)

B82Y30/00 (2011.01)

A61L27/00 (2006.01)

A61C13/00 (2006.01)

A61B6/00 (2006.01)

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

C01B, B82Y, A61L, A61C, A61B

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPESP, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.12.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	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	MARTINS, Manuel A., et al. Journal of colloid and interface science, vol. 318, nº 2, p. 210-216.	2008
D02	WU, Y. J., TSENG, Y. H., & CHAN, J. C. Crystal Growth & Design, 10(10), 4240-4242.	2010
D03	HU, Y.-Y., et al. Chemistry of Materials, vol. 23, nº9, p. 2481-2490.	2011
D04	EBRAHIMI-KAHRIZSANGI, Reza; NASIRI-TABRIZI Particuology, 2011, vol. 9, nº 5, p. 537-544.	2011

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

El objeto de las reivindicaciones 1-11 es un procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato cálcico amorfo recubiertas de citrato y dopadas con flúor, las nanopartículas resultantes de dicho procedimiento y su uso como transportador de biomoléculas, biomateriales en aplicaciones ortopédicas y odontológicas y componente de pastas dentrificas, gomas de mascar, enjuagues, etc.

El documento D01 divulga un procedimiento de preparación de micro- y nanopartículas de hidroxiapatito que comprende la mezcla de ácido cítrico con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ manteniendo el valor de pH en un valor comprendido entre 7.4 y 8.5 con NH_4OH (25%). Los precipitados obtenidos se separan por centrifugación, se lavan y se secan en un desecador (apartado 2.2).

El documento D02, relativo al estudio de la morfología controlada de cristales de fluorapatito utilizando iones citrato, describe un procedimiento de obtención del fluorapatito que comprende la mezcla de EDTA-Na-Ca, $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y NaF con distintas cantidades de ácido cítrico en agua destilada, el ajuste del pH, el envejecimiento de la mezcla durante 24h a 120°C. Posteriormente, se lava tres veces y se seca durante un día a 24°C (página 4241).

El documento D03 describe un método de preparación de un nanocomposite de hidroxiapatito que comprende la disolución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en un polímero (PLURONIC F12), la adición de citrato amónico en varias concentraciones y la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ todo a una temperatura de 4°C. La mezcla se lleva a temperatura ambiente y se forma un gel manteniendo el valor de pH comprendido entre 7.5 y 8 mediante la adición de NH_4OH . Las mezclas resultantes se secan por liofilización y se someten a tres ciclos sucesivos de sedimentación por centrifugación eliminación del sobrenadante y lavado con agua pura (Nanocomposite Synthesis).

El documento D04 describe unas nanopartículas fluorapatito para aplicaciones biomédicas y dentales con un tamaño comprendido entre 25-35nm y unos contenidos en O, F, P y Ca de 22.329% para el O, 1.219% para el F, 21.652% para el P y 54.8% para el Ca (apartado 3.3, Fig.6 y Tabla 4).

Ninguno de los documentos D01-D04 divulga un procedimiento de obtención de nanopartículas de fosfato cálcico amorfo dopado con flúor que comprenda todas las etapas y condiciones experimentales que se recogen en las reivindicaciones 1-5. Así como tampoco divulgan unas nanopartículas con el tamaño y la composición que se recogen en la reivindicación 6 para su uso como transportador de biomoléculas, biomateriales en aplicaciones ortopédicas y odontológicas y componente de pastas dentrificas, gomas de mascar, enjuagues, etc. (reivindicaciones 7-11). Además, estos no serían obvios para un experto en la materia a partir de los citados.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-11 es nuevo e implica actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.)