



REPÚBLICA ARGENTINA
PODER EJECUTIVO NACIONAL
MINISTERIO DE PRODUCCIÓN

INSTITUTO NACIONAL de la PROPIEDAD INDUSTRIAL

TÍTULO DE PATENTE DE INVENCION

AR115129B1

LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE PATENTES, CONFORME LO RESUELTO EN EL EXPEDIENTE RESPECTIVO Y EN VIRTUD DE LO DISPUESTO POR LA LEY 24.481 (T.O.1996), Y SU DECRETO REGLAMENTARIO (DECRETO 260/96, ANEXO II), EXTIENDE EN NOMBRE DE LA NACIÓN ARGENTINA EL PRESENTE TÍTULO A CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET); COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA (CNEA); UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES. INVENTOR / ES CATALANO, PAOLO NICOLAS; SCILLETTA, NATALIA ANTONELA; PEZZONI, MAGDALENA; DESIMONE, MARTÍN FEDERICO; BELLINO, MARTÍN GONZALO.

QUE ACREDITA LA CONCESIÓN DE PATENTE DE INVENCION SOBRE: RECUBRIMIENTO BIOCOMPATIBLE HÍBRIDO DE NANOPOLÍMERO-ÓXIDO METÁLICO MESOESTRUCTURADO CON ACTIVIDAD BACTERICIDA INTRÍNSECA Y UN MÉTODO PARA SU OBTENCIÓN.

CUYA DOCUMENTACIÓN ANEXA ES COPIA FIEL DE LA DEPOSITADA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL CONFORME A LO ESTABLECIDO EN EL ART. 35 DE LA LEY 24.481 (DECRETO 260/96 - ANEXO I), EL TÉRMINO POR EL QUE SE ACUERDA LA PATENTE ES POR VEINTE AÑOS IMPRORROGABLES CONTADOS A PARTIR DE LA PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD, POR LO CUAL EXPIRARÁ EL DÍA: 24 DE OCTUBRE DE 2038.

BUENOS AIRES, 31 DE MARZO DE 2021.



Patentes de Invención
Modelos de Utilidad



Marcas



Modelos y Diseños
Industriales



Transferencia de
Tecnología



Información
Tecnológica

MEMORIA DESCRIPTIVA DE LA PATENTE DE INVENCION

SOBRE

“RECUBRIMIENTO BIOCOMPATIBLE HÍBRIDO DE NANOPOLÍMERO-ÓXIDO METÁLICO MESOESTRUCTURADO CON ACTIVIDAD BACTERICIDA INTRÍNSECA Y UN MÉTODO PARA SU OBTENCIÓN”

SOLICITADA POR:

- (1) UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**
- (2) COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA (CNEA)**
- (3) CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET)**

CON DOMICILIO EN:

- (1) Viamonte 430/444, C1053ABJ Ciudad Autónoma de Buenos Aires - ARGENTINA**
- (2) Av. del Libertador 8250, C1429BNP Ciudad Autónoma de Buenos Aires - ARGENTINA**
- (3) Godoy Cruz 2290 Piso 10, C1425FQB Ciudad Autónoma de Buenos Aires - ARGENTINA**

INVENTORES:

Martín Gonzalo BELLINO: Lavalsier 3370, C1431DTH Ciudad Autónoma de Buenos Aires - ARGENTINA
Martín Federico DESIMONE: Juan B. Justo 517, B1602BKI Florida, Provincia de Buenos Aires - ARGENTINA
Magdalena PEZZONI: Aristóbulo del Valle 5155, B1621DXQ Benavidez, Provincia de Buenos Aires - ARGENTINA
Natalia Antonela SCILLETTA: Av. Mosconi 2810 2do piso, C1419EQU Ciudad Autónoma de Buenos Aires - ARGENTINA
Paolo Nicolás CATALANO: General Paz 140, B1642BTD San Isidro, Provincia de Buenos Aires - ARGENTINA

POR EL PLAZO DE 20 AÑOS

IF-2019-00098573-APN-ANP#INPI

RECUBRIMIENTO BIOCOMPATIBLE HÍBRIDO DE NANOPOLÍMERO-ÓXIDO METÁLICO MESOESTRUCTURADO CON ACTIVIDAD BACTERICIDA INTRÍNSECA Y UN MÉTODO PARA SU OBTENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el campo de la nanotecnología para la obtención de materiales biocompatibles con aplicación en dispositivos y productos biomédicos, así como otras aplicaciones en el ámbito de la salud humana. Específicamente, la presente invención se relaciona con un recubrimiento versátil de biomaterial híbrido de nanopolímero-óxido mesoestructurado con actividad antimicrobiana intrínseca, que a su vez promueve la adhesión y proliferación de células de mamífero. Más específicamente, la presente invención se refiere a una película híbrida mesoestructurada de óxido metálico con un copolímero compuesto por poli (óxido de etileno) [PEO] y poli (óxido de propileno) [PPO], con propiedades bactericidas intrínsecas y con capacidad de promover la adhesión y proliferación de células de mamífero. En una forma de realización particular de la invención, la película híbrida de nanopolímero-óxido metálico se aplica como recubrimiento para implantes y prótesis, capaz de proteger contra infecciones microbianas, al mismo tiempo que posibilita la regeneración y desarrollo de los tejidos adyacentes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Actualmente existe un gran interés en la aplicación de nanotecnología basada en polímeros en el diseño de materiales y un amplio espectro de desarrollos biomédicos. Entre los nanomateriales poliméricos disponibles, resultan de particular interés los copolímeros de poli (óxido de etileno) [PEO] hidrofílicos y de poli (óxido de propileno) [PPO] hidrofóbicos. Estos copolímeros fueron introducidos al mercado en la década de 1950 como aditivos en la industria de los alimentos y para preparaciones farmacéuticas, y atraen un particular interés para su aplicación en técnicas de suministro (*delivery*) de drogas y de auto-ensamblaje (Lundsted, L. y Schmolka, I. *The applications of block copolymer polyol surfactants. Block and graft copolymerization. John Wiley & Sons, New York, 113-255, 1976* / Nace, V. *Nonionic surfactants: polyoxyalkylene block copolymers. Vol. 60, CRC Press, 1996*). Debido a sus

propiedades anfifílicas, se sabe que los copolímeros compuestos de poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) (PEO y PPO) forman micelas en solución acuosa al superar una concentración crítica de polímero llamada concentración micelar crítica (CMC). Aumentos adicionales de concentración de surfactante causan la auto-organización de las micelas en mesofases superestructuradas (Brinker, C. J., Lu, Y., Sellinger, A. y Fan, H. *Evaporation-induced self-assembly: nanostructures made easy. Advanced materials* 11, 579-585, 1999). Por ejemplo, las estructuras copoliméricas de PEO y PPO se han utilizado para suministrar drogas, orientación a genes diana, como nano-contenedores y como agentes de moldeado para estructuras más complejas (Zhang, Y. et al. *Therapeutic surfactant-stripped frozen micelles. Nature Communications* 7, 11649, 2016. / Alakhov, V. et al. *Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 16, 113-134, 1999. / Valle, J. et al. *A phase II, window study of SP1049C as first-line therapy in inoperable metastatic adenocarcinoma of the oesophagus. Journal of Clinical Oncology* 22, 4195- 4195, 2004. / Li, S. D. & Huang, L. *Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. Gene Therapy* 13, 1313, doi:10.1038/sj.gt.3302838, 2006. / Batrakova, E. V. & Kabanov, A. V. *Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. Journal of Controlled Release* 130, 98-106, 2008).

En un intento de suplir la creciente demanda de superficies con la capacidad de crear entornos antibacterianos, se ha demostrado que los recubrimientos de copolímeros compuestos de PEO y PPO ofrecen tanto una función anti-adhesiva al alterar la hidrofiliidad de la superficie que recubren como una capacidad de ser impregnados o conjugados con agentes antibióticos. Estas aproximaciones combinan el potencial de farmacocinética y de biodistribución que proporciona el copolímero compuesto de PEO y PPO con la actividad antibacteriana del antibiótico incorporado (Veyries, M. et al. *Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. International journal of pharmaceutics* 192, 183-193, 1999. / Muszanska, A. K. et al. *Antiadhesive polymer brush coating functionalized with antimicrobial and RGD peptides to reduce biofilm formation and enhance tissue integration. Biomacromolecules* 15, 2019-2026, 2014. / Wang, R., Chua, K. L. y Neoh, K. G. *Bifunctional coating with sustained release of 4-amide-piperidine-C12 for long-term prevention of bacterial colonization on silicone. ACS Biomaterials Science & Engineering* 1, 405-415, 2015). Por ejemplo, se han utilizado conjugados de copolímero compuesto de PEO y PPO con lisosomas como recubrimiento anti-adhesivo y antibacteriano (Muszanska, A. K., Busscher, H. J., Herrmann, A., van der Mei, H. C. y Norde, W. *Pluronic-lysozyme conjugates as anti-*

adhesive and antibacterial bifunctional polymers for surface coating. Biomaterials 32, 6333-6341, 2011), y se observó que un hidrogel compuesto de copolímero funcionalizado con Cateslytin permite la prevención de infecciones en implantes médicos (Mateescu, M. et al. *Antibacterial peptide-based gel for prevention of medical implanted-device infection. PLoS ONE 10, e0145143, 2015*). Estos recubrimientos de doble función se basan en dos componentes: por un lado, el copolímero compuesto de PEO y PPO que provee una función anti-adhesiva, estructural y de cohesión, y por otro, el agente antibiótico incorporado que proporciona la función antibacteriana. De hecho, si bien se ha reportado que un número reducido de nanomateriales basados en copolímeros compuestos de PEO y PPO resultan bacteriostáticos (capaces de inhibir el crecimiento o reproducción de las bacterias) (Jagannath, C., Allaudeen, H. y Hunter, R. L. *Activities of poloxamer CRL8131 against Mycobacterium tuberculosis in vitro and in vivo. Antimicrobial agents and chemotherapy 39, 1349-1354, 1995* / Hunter, R. L., Jagannath, C., Tinkley, A., Behling, C. A. y Nolte, F. *Enhancement of antibiotic susceptibility and suppression of Mycobacterium avium complex growth by poloxamer 331. Antimicrobial agents and chemotherapy 39, 435-439, 1995*), ninguno de ellos ha demostrado tener un efecto bactericida (capacidad de eliminar bacterias) como se describe en la presente invención.

La solicitud internacional de patente WO 2014/044704 A1 divulga el uso de estructuras de dióxido de titanio como *scaffolding* o andamiaje aplicado a implantes para promover la regeneración o reparación de tejidos óseos. Adicionalmente, se menciona que el andamiaje puede combinarse con un hidrogel cuya composición puede incluir una multiplicidad de sustancias, citando como ejemplo a copolímeros compuestos de PEO y PPO, y específicamente al Pluronic® o poloxámero. Sin embargo, no se hace mención a ninguna actividad bactericida o incluso bacteriostática propia de estos copolímeros. Es decir, no se hace mención a actividad antibacteriana ni tampoco a regulación de aspectos nanoestructurales de estos copolímeros en determinadas condiciones, un aspecto que se divulga en la presente invención. Adicionalmente, la solicitud de patente WO 2014/044704 A1, si bien menciona la utilización de dichos copolímeros en la preparación del hidrogel, omite incluirlos dentro de los componentes que pueden tener actividad biológica, mencionándose sólo el quitosano, heparan sulfato, ácido hialurónico, colágenos, PLA, PLGA y análogos. Esto, nuevamente, surge del hecho de que no se conocía la capacidad bactericida que puede otorgársele a copolímeros compuestos de PEO y PPO al regular su nanoestructura como parte de un recubrimiento o película.

La solicitud de patente US 2018/027804 divulga un sistema particulado capaz de ser formulado como titania/Pluronic®, utilizado para repeler o prevenir el depósito y colonización bacteriana sobre superficies (no para su eliminación), comprendiendo partículas modificadas, incluyendo micropartículas o nanopartículas de metal, aleación, óxidos de metal, entre los cuales se menciona al óxido de titanio como posible componente, grafito o polímeros orgánicos, y una suspensión líquida para las partículas modificadas. Sin embargo, no se describe una actividad bactericida específica de copolímeros compuestos de PEO y PPO. A su vez, el sistema de partículas que divulga la solicitud US 2018/027804 es factible de ser funcionalizado con otras moléculas para cumplir diferentes funciones. Es decir, no se describe ni se sugiere la posibilidad de generar una actividad bactericida en copolímeros compuestos de PEO y PPO al regular sus aspectos nanoestructurales, como se divulga en la presente invención. Adicionalmente, no resulta menor que sólo se describe la función de repeler el depósito de bacterias, y no la capacidad de eliminarlas, es decir, no se confirma una actividad esencialmente bactericida.

En la patente US 5335373, si bien se menciona al poloxámero 188 (Pluronic® F68) como un posible antiséptico en la invención, no divulga que este polímero tenga capacidades antimicrobianas. El uso que se describe para este polímero es el de un "limpiador o removedor" biocompatible para la limpieza de heridas y oftalmología. Nuevamente, no se conocía la capacidad bactericida, como la divulgada en la presente invención, a partir de la nanoestructuración específica de copolímeros compuestos de PEO y PPO en recubrimientos o películas aplicables a superficies.

Al contrario de lo descrito en la presente invención, el arte previo que se evidencia tanto en solicitudes de patentes anteriores como en la literatura no repara en la posibilidad de generar una actividad bactericida en copolímeros compuestos de PEO y PPO al regular sus aspectos nanoestructurales (ver específicamente *Rodeheaver, George T., et al. "Mechanical cleansing of contaminated wounds with a surfactant." The American Journal of Surgery 129.3, 1975: p. 241-245 / Demirci, Selami, et al. "Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing." Biological trace element research 168.1, 2015: p. 169-180*).

Todos estos sistemas previos de implementación de copolímero compuestos de PEO y PPO típicamente se han basado en la funcionalización de las monocapas superficiales del polímero, o en la dispersión de moléculas de polímero en soluciones o geles, demostrando como mucho una escasa actividad bacteriostática.

Notablemente, se ha reportado la falta de un efecto bactericida en copolímeros compuestos de PEO y PPO (Veyries, M.-L., Faurisson, F., Joly-Guillou, M.-L. y Rouveix, B. *Control of staphylococcal adhesion to polymethylmethacrylate and enhancement of susceptibility to antibiotics by poloxamer 407. Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 1093-1096, 2000. / Trott, A. T. in *Wounds and Lacerations, Fourth Edition*, ed. Alexander T. Trott, 73-81, W.B. Saunders, 2012). Por otro lado, se han utilizado hidrogeles de copolímero compuesto de PEO y PPO para simular entornos de biopelículas en donde confinar bacterias y llevar a cabo análisis de susceptibilidad a tratamientos antimicrobianos (Clutterbuck, A. L., Cochrane, C. A., Dolman, J. y Percival, S. L. *Evaluating antibiotics for use in medicine using a poloxamer biofilm model. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 6, 2, 2007. / Yamada, H., Koike, N., Ehara, T. y Matsumoto, T. *Measuring antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa using Poloxamer 407 gel. Journal of Infection and Chemotherapy* 17, 195-199, 2011. / Gilbert, P. et al. *The use of poloxamer hydrogels for the assessment of biofilm susceptibility towards biocide treatments. Journal of applied microbiology* 85, 985-990, 1998). Esto remarca la falta de actividad bactericida de los sistemas previos de implementación de copolímeros compuestos de PEO y PPO.

Por el contrario, la presente invención se basa en determinadas características de auto-organización de la superestructura del nanopolímero compuesto de PEO y PPO para proporcionar un recubrimiento con capacidad bactericida inherente, que además promueve la adhesión y proliferación de células de mamífero. Como se describe a continuación, es posible regular las propiedades del auto-ensamblaje o auto-organización de la superestructura del nanopolímero al regular la proporción molar entre el óxido metálico y el copolímero que componen el recubrimiento para la obtención un sistema altamente bactericida.

La superficie de un biomaterial puede ser considerada estructural y funcionalmente como una interfaz viva. En este sentido, cualquier superficie de biomaterial de un implante o prótesis puede infectarse, generalmente durante la cirugía. Esto puede resultar en una prolongación significativa del proceso de cicatrización, usualmente debiéndose retirar el implante como consecuencia final, o llevando a casos más severos en los cuales corre peligro la vida del paciente. Estas infecciones asociadas a la superficie de biomateriales representan actualmente un grave problema en cirugías de implante, principalmente debido al malestar subsecuente sufrido por los pacientes, los cuales a su vez generan mayores costos de salud. De allí surge la necesidad de

obtener recubrimientos biocompatibles con la capacidad de generar entornos antibacterianos y permitir la auto-esterilización de las superficies del implante o prótesis.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una película de recubrimiento híbrida de un óxido y un copolímero compuesto de PEO y PPO formando una mesofase superestructurada, con su superestructura configurada para adquirir alta capacidad bactericida, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de promover la adhesión y crecimiento de células de mamífero. A los efectos de la presente invención, las designaciones poli (óxido de etileno) y PEO se utilizarán indistintamente. Del mismo modo se utilizarán las designaciones poli (óxido de propileno) y PPO.

Por lo tanto, de acuerdo a un primer aspecto, un objeto de la presente invención es una película de recubrimiento híbrida que comprende:

- a) una matriz compuesta por un óxido metálico y
- b) una carga de copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno),

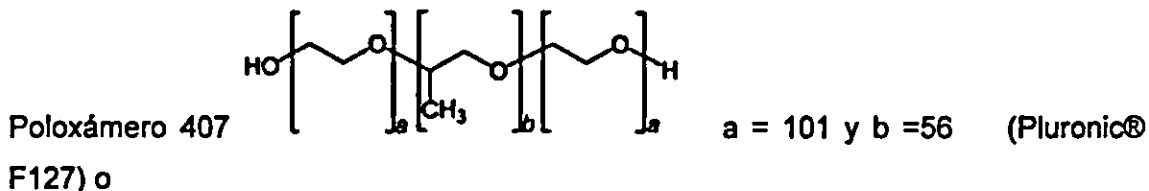
en donde el óxido y el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) se encuentran formando una mesofase superestructurada.

En una forma de realización particular de la invención, el óxido es de titanio y con el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) se encuentran formando en la película una mesofase superestructurada a partir de una proporción molar $[Ti]/[Copolímero]$ de partida en el rango de 1:0,0025 – 1:0,02.

En una forma de realización más particular de la invención, el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) presenta una unidad repetitiva [PEO-PPO].

En una forma de realización aún más particular de la invención, el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) presenta una unidad repetitiva [PEO-PPO-PEO].

En incluso otra forma de realización particular de la invención, el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) es preferentemente un poloxámero de bloque [PEO-PPO-PEO] seleccionado del grupo formado por



Poloxámero 403: $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{H}$ (Pluronic® P123).

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, la película de recubrimiento híbrida resulta modular y escalable, de modo de poder ser adaptada y aplicada a distintas superficies.

En una forma de realización particular de este segundo aspecto, la superficie a la cual se aplica la película de recubrimiento híbrida corresponde a la de un implante, o una prótesis, u otros dispositivos médicos que requieran una superficie biocompatible con propiedades bactericidas y que a su vez permitan la adhesión y proliferación de células de mamífero.

En un tercer aspecto, la presente invención provee un método para obtener un recubrimiento de película híbrida delgada mesoestructurada de óxido metálico basado en copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) a partir de una solución precursora en la cual la fracción molar de [Óxido metálico]:[Copolímero] varía en el rango de 1:0,0025 – 1:0,02. Esta relación es crítica para lograr características antimicrobianas del material biocompatible y se obtiene regulando las proporciones de [Óxido metálico]:[Copolímero] en la solución precursora entre los rangos mencionados, bajo determinadas condiciones que se detallan a continuación, resultando en la obtención de una mesofase superestructurada con las características nanométricas que se detallan a continuación, en referencia a las Figuras 1, 2 y 3.

El método de la presente invención comprende las siguientes etapas:

A) agregar el copolímero compuesto de PEO y PPO, junto con agua, a una solución de TiCl_4 /etanol, siendo las fracciones molares de la solución precursora de TiCl_4 :etanol: H_2O :copolímero equivalentes a 1:40:10:S, en donde S varía en el rango de 0,0025-0,02;

B) formar un recubrimiento depositando la solución obtenida en el primer paso en la superficie para formar una superficie recubierta;

C) exponer la superficie recubierta a una atmósfera de humedad relativa en el rango de 30%-70% durante un período en el rango de 12-36 hs; y

D) someter la superficie recubierta a un tratamiento de consolidación térmica.

En una forma de realización preferida de este aspecto de la invención, en la etapa B el recubrimiento se forma por *spin-coating* a 2500 rpm, 35°C y humedad relativa (RH) de 15%.

En otra forma de realización preferida de este aspecto de la invención, en la etapa C la superficie recubierta se expone a una atmósfera de humedad relativa equivalente al 50% durante 24 horas.

En aún otra forma de realización preferida de este aspecto de la invención, en la etapa D la consolidación térmica consiste en tres etapas sucesivas de 1 hora cada una a 60°C, 130°C y 180°C respectivamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la caracterización estructural de películas delgadas mesoestructuradas de copolímero (A-D muestran resultados para Pluronic® F127 y E-H para Pluronic® P123). A) muestra una vista de sección transversal de la película híbrida de relación molar Ti:F127 = 1:0,005 mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM). La línea blanca de escala corresponde a 200 nm. B-H) representan patrones SAXS (dispersión de rayos X en ángulo pequeño) 2D de las muestras con las distintas concentraciones de copolímero utilizadas, mostrando los arreglos de orden local. Las distancias promedio paralelas (d_R) y perpendiculares (d_z) a la superficie de la película se midieron a partir de los patrones SAXS de acuerdo con las proporciones de Ti:Copolímero como se indica para cada muestra en la esquina inferior derecha de cada figura.

La Figura 2 muestra la espectroscopia Raman de la película con relación molar Ti:F127 = 1:0,005. Las flechas superiores a las 300 unidades indican los picos de

dióxido de titanio (Niilisk, A. et al. *Structural study of TiO₂ thin films by micro-Raman spectroscopy. Open Physics* 4, 105-116, 2006), mientras que las flechas inferiores a las 300 unidades indican la presencia de modos de vibración de carbono (Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G. y Grasselli, J. G. *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules, Elsevier, 1991*). Los resultados muestran que los recubrimientos poseen una estructura híbrida. El análisis se llevó a cabo utilizando un LabRAM HR (Horiba Jobin Yvon, Kyoto, Japón).

La Figura 3 muestra imágenes de perfilometría óptica de la película de relación molar Ti:F127 = 1:0,005: Imagen de topografía 3D (A) y su correspondiente perfil de línea (B) mostrando una superficie nano-irregular. Nótese que sólo la resolución en la dirección nanométrica Z debe ser considerada. La textura superficial fue caracterizada utilizando un perfilómetro óptico sin contacto (Veeco Wyco NT1100).

La Figura 4 muestra la actividad bactericida de las superficies mesoestructuradas: Películas híbridas cargadas con Pluronic® F127 (A) y Pluronic® P123 (B) con concentraciones variables de copolímero fueron expuestas a 10^6 UFC ml⁻¹ de *Salmonella typhimurium*. Se reporta la tasa de supervivencia de bacterias luego de 24 horas de exposición con varias películas híbridas cargadas de copolímero.

La Figura 5 muestra la variación de la respuesta bactericida en función del tiempo: Muerte progresiva (%) de las bacterias *Salmonella typhimurium* cuando se incuban con películas de relación molar Ti:F127 = 1:0,005 durante hasta 24 horas.

La Figura 6 muestra los resultados de la actividad bactericida de la película híbrida cargada con Pluronic® F127 de relación molar Ti:F127 = 1:0,005 correspondiente a 5 exposiciones, cada una con una cepa clínicamente significativa de bacterias (*S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis*).

La Figura 7 muestra la actividad bactericida de amplio espectro de recubrimientos de dióxido de titanio cargados con Pluronic® F127 de relación molar Ti:F127 = 1:0,005 al ser expuestos a cinco cepas de bacterias clínicamente significativas luego de 24 horas (expuestos a 1×10^6 UFC ml⁻¹).

La Figura 8 muestra estudios de biocompatibilidad. A) Representa el porcentaje de actividad metabólica de osteoblastos (ensayo MTT) desarrollados en placas de cultivo normales (control), en recubrimientos de titania sin Pluronic® F127 (sin F127) y en

recubrimientos cargados con Pluronic® F127 (con F127) de relación molar Ti:F127 = 1:0,005, en donde el grupo Control en el día 0 fue normalizado al 100% en cada fracción de tiempo; ANOVA de dos vías: ns entre los grupos. B) muestra micrografías de fluorescencia de osteoblastos en las mismas muestras luego de 48 horas de incubación. La magnificación es de 400x. La línea de escala corresponde a 50 μ m.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención describe una película de recubrimiento híbrida de óxido metálico y copolímero compuesto de PEO y PPO formando una mesofase superestructurada, con su superestructura configurada para adquirir alta capacidad bactericida, manteniendo al mismo tiempo la capacidad de promover la adhesión y crecimiento de células de mamífero.

El término "aproximadamente" como se utiliza en la presente cuando se refiere a un valor mensurable significa que comprende variaciones de $\pm$ 10% desde la cantidad especificada.

Como se utiliza en este documento, los términos "comprende", "tiene" e "incluye" y sus conjugaciones, como se utilizan en la presente, significan "incluyendo pero no limitado a".

A los efectos de la presente invención el término "Nanoestructura" o variaciones como "nanoestructurado/a" está destinado a hacer referencia a una estructura de dimensiones nanométricas (es decir, de dimensiones contenidas entre la escala molecular y la escala microscópica, o entre 0,1 y 100 nm). A los efectos de la presente invención, una nanoestructura es el resultado de la auto-organización o auto-ensamblaje de moléculas o monómeros de un copolímero.

El término "Nanopolímero" en la presente invención se refiere a un polímero o copolímero capaz de formar nanoestructuras bajo determinadas condiciones.

A los efectos de la presente invención, el término "Mesofase" se refiere a un estado de agregación de la materia en el rango entre 2 y 50 nm que corresponde a un intermedio entre líquido y sólido. En una mesofase, las moléculas se ordenan sólo parcialmente en la red cristalina, otorgándole al material algunas propiedades fisicoquímicas

diferentes a las encontradas en una u otra fase. Algunos materiales orgánicos demuestran más de una transición de un estado sólido a un estado líquido, o más bien demuestran una "cascada de transiciones", y puede considerarse que involucran nuevas fases. Las propiedades mecánicas y de simetría de estas nuevas fases son intermedias entre las propiedades de un líquido y un cristal.

Por "Superestructura" y variaciones como "superestructurada" o "superestructural" en la presente invención se hace referencia a la formación de estructuras de órdenes de complejidad superiores en polímeros o soluciones sólidas ordenadas. En relación a un polímero o copolímero, la superestructura es un patrón de estructuras repetitivas en un orden de complejidad superior al de las unidades monoméricas, que origina una disposición en red diferente a la presentada por el polímero en sí mismo.

En la presente invención el término "Biocompatibilidad" o "biocompatible" se refiere a la capacidad de ciertos materiales de interactuar en contacto con tejidos vivos elicitando una respuesta inmune apropiada para una determinada situación, o bien sin elicitando una respuesta inmune significativa, e interactuando de forma apropiada con los mecanismos de regeneración de tejidos. A los efectos de la presente invención, el término "biocompatible" describe un material que compone la superficie de un implante o prótesis, que es capaz de cumplir su función sin causar una respuesta inmune significativa al interactuar con tejidos del paciente, y sin causar complicaciones relacionadas a los mecanismos de regeneración de tejidos.

De acuerdo con la presente invención, se entiende como técnica de *spin-coating* al proceso donde se deposita una cantidad de solución precursora sobre el sustrato y luego éste se rota a gran velocidad para lograr una distribución uniforme de la solución por fuerza centrífuga. Este tipo de recubrimientos puede también ser obtenido mediante otros métodos de depósito como por ejemplo *dip-coating* o *spray-coating*.

Cuando una magnitud o cantidad está definida como dentro de un rango, a los efectos de la presente invención se entiende que la misma puede establecerse en cualquier valor intermedio de dicho rango, incluyendo sus extremos.

De acuerdo a un primer aspecto, un objeto de la presente invención es una película de recubrimiento híbrida que comprende:

- a) una matriz de un óxido metálico, como pueden ser TiO_2 , SiO_2 , ZrO_2 , o una combinación de los mismos; y

b) una carga de copolímero compuesto de PEO y PPO, en donde el óxido y el copolímero compuesto de PEO y PPO se encuentran formando una mesofase superestructurada.

La matriz se compone preferentemente de dióxido de titanio, debido a la alta biocompatibilidad de este material y su baja solubilidad en medio fisiológico (*Schmidt, J. y Vogelsberger, W. Aqueous long-term solubility of titania nanoparticles and titanium (IV) hydrolysis in a sodium chloride system studied by adsorptive stripping voltammetry. Journal of solution chemistry 38, 1267-1282, 2009*). Estas características contribuyen en gran medida a la capacidad del recubrimiento de permitir la adhesión y proliferación de células de mamífero, lo cual resulta de gran importancia en el recubrimiento de implantes o prótesis que interactúan directamente con los tejidos del paciente.

En una forma de realización particular de la invención, el óxido metálico y el copolímero compuesto de PEO y PPO se encuentran formando una mesofase superestructurada en una proporción molar [Óxido metálico]:[Copolímero] en el rango de 1:0,0025 – 1:0,02.

Este rango de proporción molar de [Óxido metálico]:[Copolímero] permite la obtención de una mesofase liotrópica superestructurada con la disposición nanoestructural necesaria para lograr el efecto bactericida. Particularmente, la característica bactericida del recubrimiento se debe esencialmente a aspectos superestructurales de la mesofase. Los inventores han regulado sistemáticamente la proporción molar de [Óxido metálico]:[Copolímero] para modular la estructura de la mesofase hasta alcanzar la estructura deseada. Los patrones de SAXS (ver FIG. 1 B-H) muestran anillos de difracción bien definidos que indican dominios ordenados localmente en la mesoescala. Pueden observarse las nanoestructuras periódicas, mostrando varias distancias promedio entre sí, obtenidas al regular los parámetros de síntesis, en este caso la proporción molar de [Óxido metálico]:[Copolímero].

La caracterización estructural (FIG. 1) de películas delgadas mesoestructuradas de copolímero (A-D muestran resultados para Pluronic® F127 y E-H para Pluronic® P123). A) muestra una vista de sección transversal de la película híbrida de fracción Ti:F127 = 1:0,005 mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM). La línea blanca de escala corresponde a 200 nm. B-H) representan patrones SAXS (dispersión de rayos X en ángulo pequeño) 2D de las muestras con las

distintas concentraciones de copolímero utilizadas, mostrando los arreglos de orden locales. Las distancias promedio paralelas (d_R) y perpendiculares (d_Z) a la superficie de la película se midieron a partir de los patrones SAXS de acuerdo con las proporciones de $[Ti]/[Copolímero]$ como se indica para cada muestra en la esquina inferior derecha de cada figura.

Al analizar en detalle los patrones de SAXS, se observa que la distorsión de señal no se distribuye a lo largo de un círculo, sino más bien de una elipse. Esto se debe a una contracción anisotrópica que ocurre a partir de la adhesión de las películas al sustrato. Las mesofases modeladas de copolímero se muestran elípticas, distribuidas homogéneamente y con distancias uniformes entre nanoestructuras, tanto paralela como perpendicularmente. Los análisis Raman y la perfilometría (FIGS. 2 y 3) confirman la formación de una película híbrida con nano-rugosidades típicas.

Los inventores han observado que las arquitecturas de organización a escala nanométrica y la composición química de la película híbrida de dióxido de titanio-copolímero de PEO y PPO (particularmente en las proporciones molares mencionadas), guardan un parecido con la pared celular propia de un microorganismo patógeno. Esta similitud le permite a la película híbrida interferir con la síntesis de la pared celular, siendo esta característica el núcleo de su actividad bactericida.

Al modular las fracciones molares de $[Óxido\ metálico]:[Copolímero]$, los inventores han obtenido una película con distancias topográficas de alrededor de 14 nm (FIG. 1), resultando una mesoarquitectura capaz de matar bacterias con alta eficiencia. Se demostró que las mesoestructuras de estas características son capaces de alcanzar efectos bactericidas de alrededor de 136.000 bacterias por área de cm^2 durante las primeras 4 horas. Las películas de titania sin Pluronic® no mostraron actividad bactericida.

Los inventores buscaron obtener las características estructurales específicas descritas en base a las similitudes que se observan entre los dominios químicos presentados por las estructuras de copolímero compuesto de PEO y PPO de la invención y las estructuras de peptidoglicanos y lipopolisacáridos presentes en la membrana y pared celular bacterianas. Estas similitudes posibilitan que las estructuras de copolímero compuesto de PEO y PPO de la invención interfieran con el proceso de renovación continuo de la pared celular de la bacteria al debilitar el andamiaje de peptidoglicanos dentro de dicha pared celular y conduciendo a la lisis osmótica, causando la

subsecuente muerte de la bacteria. Las estructuras de copolímero compuesto de PEO y PPO de la invención ofrecen interfaces de interacción con las bacterias capaces de "confundir" a la maquinaria bacteriana de ensamblaje de peptidoglicanos durante la síntesis y renovación de la pared celular. Esta estrategia resulta de interés adicional cuando se tiene en cuenta la baja o nula probabilidad que tiene de generar el desarrollo de resistencias bacterianas, como sucede con los antibióticos.

Los inventores han tenido en cuenta el hecho de que las células de mamífero no presentan este tipo de pared celular basada en peptidoglicanos, por lo que el efecto de interferencia resulta altamente selectivo para bacterias, sin tener efecto negativo alguno sobre células de mamífero. De hecho, las células osteoblásticas se adhieren normalmente a la superficie de los recubrimientos de la invención, y proliferan tal y como lo hacen en placas de cultivo estándar. Así, los inventores también resuelven el problema de aplicaciones previas de la funcionalización con antibióticos de monocapas de copolímero, en las cuales las características antiadhesivas suprimen toda posibilidad de integración celular.

En una forma de realización particular de la invención, el dióxido de titanio y el copolímero compuesto de PEO y PPO se encuentran formando una mesofase superestructurada en una proporción molar [Óxido metálico]:[Copolímero] de 1:0,005. Para esta proporción, la eficiencia bactericida es mayor al 99,99 %, valor deseable para superficies antibacterianas. Dicha eficiencia varía significativamente para relaciones [Óxido metálico]:[Copolímero] apartadas de dicho valor óptimo, siendo de entre el 90% y el 99% para formulaciones con relaciones de [Óxido metálico]:[Copolímero] de 1:0,0025 y 1:0,01.

En una forma de realización más particular de la invención, el copolímero compuesto de PEO y PPO presenta una unidad repetitiva [PEO-PPO].

En una forma de realización aún más particular de la invención, el copolímero compuesto de PEO y PPO presenta una unidad repetitiva [PEO-PPO-PEO].

En incluso otra forma de realización particular de la invención, el copolímero compuesto de PEO y PPO es preferentemente poloxámero 407 (Pluronic® F127) o poloxámero 403 (Pluronic® P123) de bloque [PEO-PPO-PEO].

En incluso otra forma de realización particular de la invención, el copolímero compuesto de PEO y PPO es preferentemente poloxámero 407 (Pluronic® F127) o poloxámero 403 (Pluronic® P123) de bloque [PEO-PPO-PEO], o combinaciones de los mismos.

Otros poloxámeros que pueden utilizarse en los recubrimientos de la presente invención incluyen poloxámero 402 (PLURONIC® P122), poloxámero 181 (PLURONIC® L61), poloxámero 401 (PLURONIC® L121), poloxámero 185 (PLURONIC® P65), y poloxámero 338 (PLURONIC® F108), o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, la película de recubrimiento híbrida resulta modular y escalable, de modo de poder ser adaptada y aplicada a distintas superficies.

En una forma de realización particular de este segundo aspecto, la superficie a la cual se aplica la película de recubrimiento híbrida corresponde a la de un implante, o una prótesis, u otros dispositivos médicos que requieran una superficie biocompatible con propiedades bactericidas y que a su vez permitan la adhesión y proliferación de células de mamífero.

En un tercer aspecto, la presente invención describe un método para obtener un recubrimiento de película híbrida delgada mesoestructurada de óxido metálico basado en copolímero compuesto de PEO y PPO, que comprende un primer paso que consiste en agregar el copolímero compuesto de PEO y PPO, junto con agua, a una solución de TiCl_4 /etanol, siendo la fracción molar de la solución precursora de TiCl_4 :etanol: H_2O :copolímero equivalente a 1:40:10:S, en donde S varía en el rango de 0,0025-0,02, un segundo paso que consiste en depositar la solución obtenida en el primer paso en una superficie mediante recubrimiento por (pero no limitado a) *spin-coating* a 2500 rpm, 35°C y humedad relativa (RH) de 15%, un tercer paso que consiste en exponer la superficie en la que ocurrió la deposición a una atmósfera de 50% RH durante 24 horas, y un cuarto paso que consiste en someter la misma superficie a un tratamiento de consolidación térmica que consiste en tres etapas sucesivas de 1 hora a 60°C, 130°C y 180°C respectivamente. Mediante otros métodos de depósito como *dip-coating* o *spray-coating* se obtuvieron similares recubrimientos con efectos antibacterianos equivalentes para el rango de composiciones descriptas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Síntesis y deposición de recubrimientos de película híbrida delgada mesoestructurada de titania basados en Pluronic®.

Se lavaron exhaustivamente piezas de vidrio de portaobjetos para microscopía de 26 mm de largo y 20 mm de ancho (5,2 cm²) o cubreobjetos de vidrio de 20 mm de diámetro (3,14 cm²) (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania) con detergente neutro (Extran®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), que luego fueron enjuagadas con agua miliQ, acetona e isopropanol, y finalmente secadas bajo flujo de nitrógeno. Los recubrimientos de película delgada mesoestructurada de titania se obtuvieron a partir de una solución de TiCl₄/etanol a la cual se agregó el surfactante orgánico Pluronic® F127 o bien Pluronic® P123 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) y agua. La composición final de las soluciones precursoras fue de fracción molar TiCl₄:etanol:H₂O:Pluronic® equivalente a 1:40:10:S, en donde S fue 0,0025; 0,005; y 0,01 para Pluronic® F127, y 0,0025; 0,005; 0,01; y 0,02 para Pluronic® P123. Los recubrimientos de película delgada de titania sin Pluronic® se prepararon siguiendo el mismo protocolo pero omitiendo la adición del surfactante Pluronic®. Los recubrimientos fueron depositados en los sustratos de vidrio mediante recubrimiento por *spin-coating* a 2500 rpm, 35°C y humedad relativa (RH) de 15%. Luego de la deposición, las muestras fueron colocadas en una cámara de 50% RH durante 24 horas y sometidas a un tratamiento de consolidación térmica que consiste en tres etapas sucesivas de 1 hora a 60°C, 130°C y 180°C respectivamente.

Como resultado, se obtuvieron recubrimientos cuyas micrografías de electrones se registraron utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM; emisión de campo ZEISS LEO 982 GEMINI) en el modo electrones secundarios, utilizando un detector incluido en la lente para mejorar la resolución. La mesoestructura de las películas fue analizada utilizando dispersión de rayos X a ángulo pequeño (Equipo XEUS 1.0 de XENOCSS, Francia; $\lambda = 0,15419$ nm que es el promedio medido de longitud de onda de rayos X de las líneas de emisión CuK α 12) a un ángulo de análisis de 0,3° de incidencia y una distancia entre la muestra y el detector de 1377,11 mm. Esta disposición se equipó con un detector de rayos X contador de fotones 2D Pilatus 100k (DECTRIS, Suiza). Los resultados para cada película (según el valor de S en la composición de la solución precursora) se muestran en la Figura 1 B-H.

Ejemplo 2 – Determinación de la actividad antibacteriana de los recubrimientos de película híbrida

Los patógenos clínicamente significativos utilizados en este ejemplo fueron: La bacteria Gram-negativa *Salmonella typhimurium*, (LT2), *Escherichia coli* (K12) y *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), y las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Bacillus subtilis* (colección de laboratorio). Estas cepas fueron cultivadas rutinariamente a 37°C en caldo Luria-Bertani (LB) (extracto de levadura, 5 g L⁻¹; NaCl, 10 g L⁻¹ y triptona 10 g L⁻¹); se agregó agar 15 g L⁻¹ en los casos en que se utilizó medio sólido. La actividad de los recubrimientos de película híbrida delgada mesoestructurada de titania basados en Pluronic® depositados en las piezas de vidrio de 5,2 cm² fue puesta a prueba con las cepas bacterianas siguiendo la metodología estándar para caracterizar recubrimientos antibacterianos (*Association, J. S. Antimicrobial products-Test for antimicrobial activity and efficacy, Japanese Industrial Standard JIS Z 2801, Número de referencia JIS, 2000*). Las superficies de muestra fueron expuestas a inoculaciones de 300 µL con una concentración de aproximadamente 1 x 10⁸ UFC mL⁻¹ (donde UFC significa unidad formadora de colonias). Las inoculaciones fueron preparadas al diluir los cultivos transcurridos durante la noche en solución salina estéril, esparciéndolos luego sobre la superficie de cada muestra por triplicado. Las muestras inoculadas fueron incubadas a 37°C durante 4, 8, 16 o 24 horas en una cámara humidificada para impedir la evaporación. Se tomaron alícuotas de las suspensiones bacterianas antes (0 horas) y después de la exposición a los recubrimientos de película híbrida; la suspensión no tratada y las diluciones en serie se colocaron en placas de medio LB sólido. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y las colonias fueron contadas para analizar la viabilidad celular. Las muestras de control fueron piezas de vidrio recubiertas de titania sin Pluronic®. La eficiencia bactericida fue expresada en referencia a las UFC a 0 horas. Los resultados obtenidos se muestran las Figuras 4 a 7, así como en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1:

Resultados de pruebas de actividad antibacteriana de recubrimientos de dióxido de titanio cargados con Pluronic® F127 para cinco cepas de bacterias clínicamente significativas.

Cepas	UFC ^a 0 h	Recubrimientos cargados con F127		
		UFC 24 h	D% ^b	R ^c
<i>S. typhimurium</i>	2,28 x 10 ⁸	<10	>99,999	>6,43
<i>P. aeruginosa</i>	4,2 x 10 ⁸	<10	>99,999	>6
<i>E. coli</i>	6,2 x 10 ⁸	<10	>99,999	>5,69
<i>S. aureus</i>	3,4 x 10 ⁸	<10	>99,999	>3,74
<i>B. subtilis</i>	2,5 x 10 ⁸	1 x 10 ³	99,933	2,67

^a Se calcularon UFC a partir de la media de 3 relevamiento de UFC.

^b Reducción porcentual.

^c Valor de actividad antimicrobiana.

La actividad antibacteriana fue calculada utilizando dos parámetros distintos: Reducción porcentual (D%) y valor de la actividad antimicrobiana (R). D% fue calculada a partir de la proporción porcentual de la cuenta de microbios en recubrimientos de titanio sin Pluronic® – recubrimientos de titanio mesoestructurados basados en Pluronic®.

R fue calculada de acuerdo a JIS Z 2801:2000 (Association, J. S. Antimicrobial products-Test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Industrial Standard JIS Z 2801, Reference number. JIS, 2000):

$$R = \log (B/C)$$

en donde B es el número promedio de bacterias viables en los recubrimientos de titanio sin Pluronic® luego de 24 horas y C es el número promedio de bacterias viables en los recubrimientos de titanio mesoestructurados basados en Pluronic®. Los resultados obtenidos se detallan en la Figura 6.

Ejemplo 3 – Cultivos de células osteoblásticas sobre recubrimientos de película híbrida: Adhesión, proliferación y ensayos de morfología

Se cultivaron células osteoblásticas MC3T3E1 derivadas de calvaria de ratón (ATCC® CRL-2593™) en placas de cultivo de 100 mm a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 80 mg L⁻¹ de gentamicina y 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB). Cuando se alcanzó una confluencia del 70–80%, se realizó un subcultivo de las células utilizando tripsina-1 mM EDTA 0,1% en buffer fosfato salino (PBS) libre de Ca₂⁺–Mg₂⁺. Para los

experimentos, se colocaron cubreobjetos de vidrio de 20 mm de diámetro recubiertos con películas de titania sin Pluronic® (muestras de control) y con películas de titania mesoestructuradas basadas en Pluronic® en placas multi-well de 12 compartimentos. Las células fueron sembradas en los recubrimientos de película a una densidad de 2×10^4 células por compartimento. Se dejó caer sobre las muestras un volumen de 250 μL conteniendo las células, y se dejaron transcurrir 4 horas para permitir la adhesión de las células. Luego, 2 mL de medio se agregó a cada compartimento. Las células de control fueron sembradas directamente en compartimentos de la placa de cultivo.

La viabilidad celular fue analizada por el ensayo MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol] (Sigma-Aldrich) inmediatamente luego del paso en el que se permite la adhesión de las células (días 0) y luego de 1, 3 y 7 días de cultivo. Luego de los períodos de incubación, se agregó una solución de MTT 0.4 mg mL^{-1} a cada compartimento y las placas se incubaron (37°C , CO_2 5%) durante 4 horas. Luego, se retiró la solución de MTT, los compartimentos fueron lavados con PBS y se disolvieron los cristales de formazán azul utilizando DMSO. La solución púrpura fue midió a 540 nm. El porcentaje de actividad metabólica celular se expresó en relación al grupo de control del día 0. Los resultados se obtuvieron a partir de muestras por triplicado en tres cultivos independientes. Los resultados obtenidos se detallan en la Figura 8A.

Se identificaron la F-actina y los núcleos celulares mediante faloidina Alexa Fluor® 488-faloidina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), respectivamente. Luego de 2 días en cultivo, las muestras se fijaron con paraformaldehído 3,7% durante 20 minutos y permeabilizadas/bloqueadas con Tritón X-100 0,1% y BSA 1% en PBS durante 30 minutos, respectivamente. Luego, las muestras fueron teñidas con 488-phalloidin (dilución 1:40 Alexa Fluor®) y Hoechst 33258 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 30 minutos. Las muestras fueron luego visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TS100). Las tinciones fueron analizadas por triplicado. Los resultados se muestran en la figura 8B.

Datos estadísticos

Todos los resultados cuantitativos fueron obtenidos de muestras por triplicado. Los datos fueron expresados como media $\pm$ SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando ANOVA de dos vías. Los valores correspondientes a $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Las formas de realización descritas en forma ilustrativa en la presente pueden ser llevadas a la práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no específicamente descritos en la presente. Así, por ejemplo las expresiones "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. deben leerse en forma amplia y sin limitación. Adicionalmente, los términos y expresiones empleados en la presente han sido usados como términos de descripción y no de limitación y no hay intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención.

Así, debe entenderse que aunque las presentes formas de realización han sido específicamente descritas mediante formas de realización preferidas y características opcionales, modificaciones y variaciones de las mismas pueden ser concebidas por aquellos expertos en el arte y que tales modificaciones y variaciones están consideradas dentro del alcance de la invención.

Todas las patentes, solicitudes de patente, libros de texto y publicaciones con arbitraje descritos en la presente están de ese modo incorporadas como referencia en su totalidad. Además, cuando una definición o uso de un término en una referencia, la cual es incorporada como referencia en la presente es inconsistente o contrario a la definición de ese término provista en la presente, la definición de ese término provista en la presente es la aplicable y la definición de ese término en la referencia no es aplicable.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como es comúnmente entendido por una persona experta en el arte al cual pertenece la invención.

Para proporcionar una descripción más concisa, algunas de las expresiones cuantitativas dadas en la presente no están calificadas con el término "aproximadamente". Se entiende que, si el término "aproximadamente" es utilizado explícitamente o no, cada cantidad dada en la presente está destinada a referirse al valor real dado y también está destinada a referirse a la aproximación a dicho valor dado que sería inferida razonablemente en base al conocimiento normal en el arte, incluyendo equivalentes y aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medición para dicho valor dado.

Los entendidos en la técnica reconocerán o podrán determinar, usando solamente la experimentación de rutina, muchos equivalentes de los procedimientos específicos, realizaciones, reivindicaciones y ejemplos descritos en el presente. Dichos equivalentes se consideran como dentro del alcance de la presente invención y cubiertos por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un recubrimiento de película híbrida que presenta actividad bactericida, caracterizado porque comprende
 - A) una matriz compuesta por un óxido metálico y
 - B) un copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) [PEO] y de poli (óxido de propileno) [PPO];en donde A) y B) forman una mesofase superestructurada.
2. El recubrimiento de película híbrida de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el óxido es dióxido de titanio.
3. El recubrimiento de película híbrida de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) [PEO] y de poli (óxido de propileno) [PPO] presenta una unidad repetitiva de estructura [PEO-PPO].
4. El recubrimiento de película híbrida de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) [PEO] y de poli (óxido de propileno) [PPO] presenta una unidad repetitiva de estructura [PEO-PPO-PEO].
5. El recubrimiento de película híbrida de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) [PEO] y de poli (óxido de propileno) [PPO] es un poloxámero.
6. El recubrimiento de película híbrida de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el poloxámero se selecciona de un grupo compuesto por poloxámero 407, poloxámero 403, poloxámero 402, poloxámero 181, poloxámero 401, poloxámero 185, y poloxámero 338, o una combinación de los mismos.
7. El recubrimiento de película híbrida de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque el poloxámero es poloxámero 407 o poloxámero 403.
8. Un recubrimiento de película híbrida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el dióxido de titanio y el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) [PEO] y de poli (óxido de

- propileno) [PPO] forman una mesofase superestructurada en una proporción molar [Óxido metálico]:[Copolímero] en el rango de 1:0,0025 – 1:0,02.
9. Un recubrimiento de película híbrida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el recubrimiento de película híbrida es modular y escalable, de modo de poder ser adaptado y aplicado a distintas superficies.
10. Un recubrimiento de película híbrida de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque es aplicable a la superficie de un implante, o una prótesis, o cualquier otro dispositivo médico o biomédico que requiera una superficie biocompatible.
11. Un implante o prótesis caracterizado porque comprende:
- A) una porción interna compuesta de un material no biocompatible, parcialmente biocompatible o biocompatible, y
 - B) una porción externa compuesta por el recubrimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
12. Un método para obtener el recubrimiento de la reivindicación 1 sobre una superficie, que comprende las siguientes etapas:
- A) agregar el copolímero compuesto de poli (óxido de etileno) [PEO] y de poli (óxido de propileno) [PPO], junto con agua, a una solución de TiCl_4 /etanol, siendo la fracción molar de la solución precursora de TiCl_4 :etanol: H_2O :copolímero equivalente a 1:40:10:S, en donde S [Óxido metálico] varía en el rango de 0,0025-0,02.
 - B) formar el recubrimiento depositando la solución obtenida en el primer paso en la superficie mediante recubrimiento;
 - C) exponer la superficie recubierta a una atmósfera de humedad relativa en el rango de 30%-70% durante un período en el rango de 12-36 hs; y
 - D) someter la superficie recubierta a un tratamiento de consolidación térmica.
13. El método de la reivindicación 12, caracterizado porque en la etapa B el recubrimiento se forma por *spin-coating* a 2500 rpm, 35°C y humedad relativa (RH) de 15%.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, caracterizado porque en la etapa C la superficie recubierta se expone a una atmósfera de humedad relativa equivalente al 50% durante 24 horas.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, caracterizado porque en la etapa D la consolidación térmica consiste en tres etapas sucesivas de 1 hora cada una a 60°C, 150°C y 180°C respectivamente.



Lucía Scarpatti
Mat. 2198

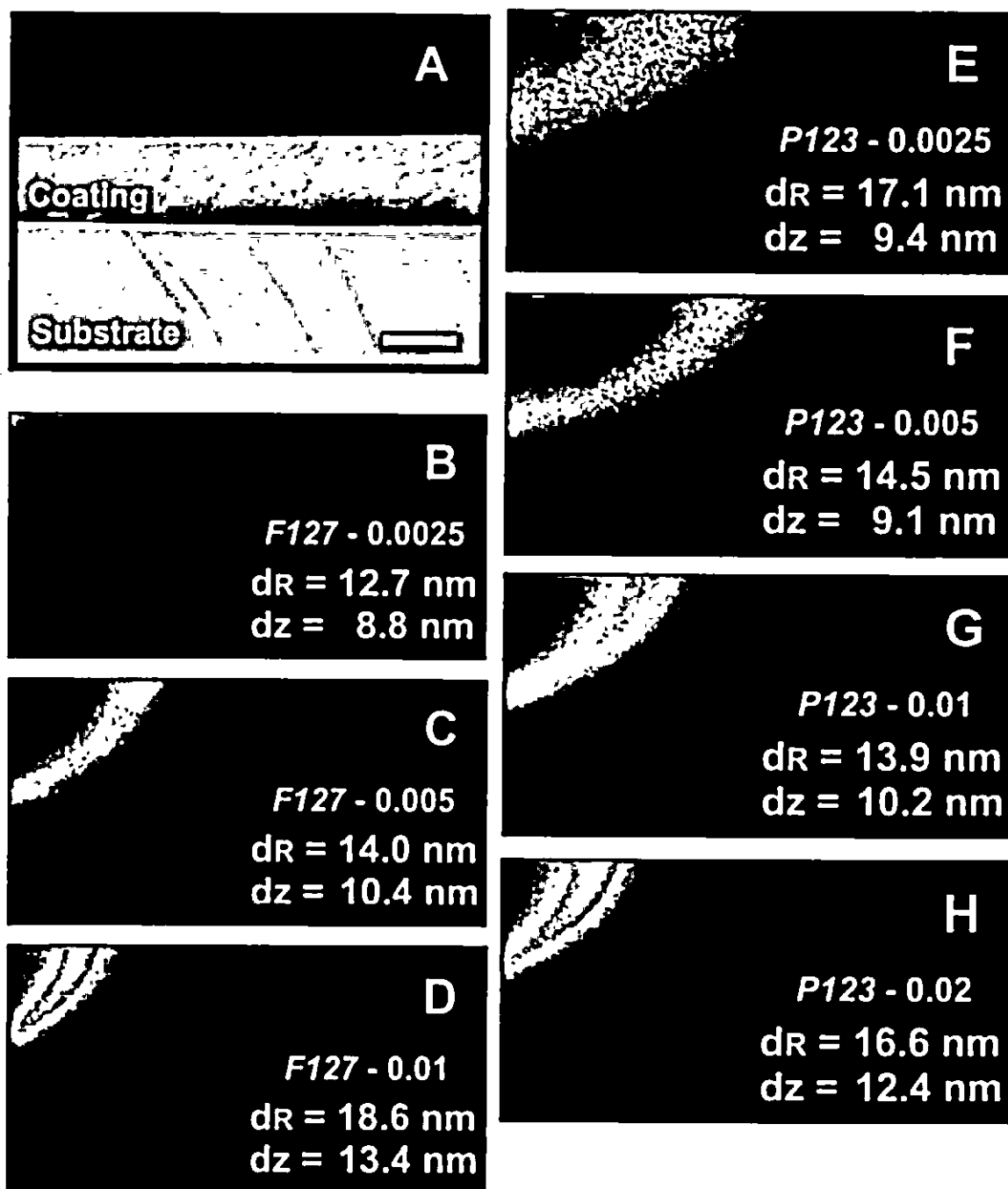


FIGURA 1

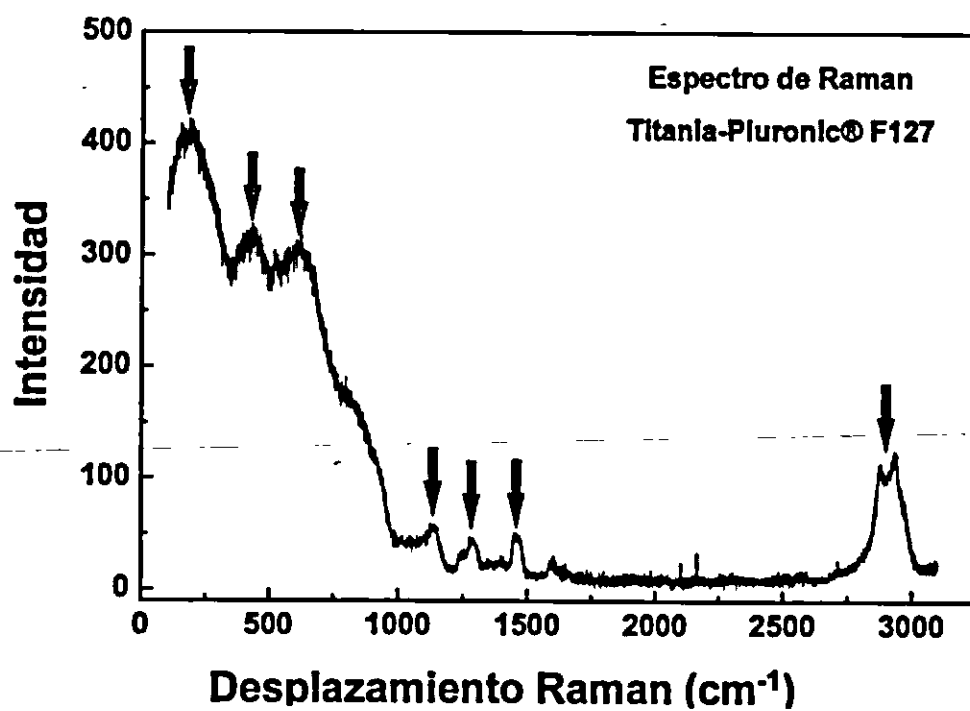


FIGURA 2

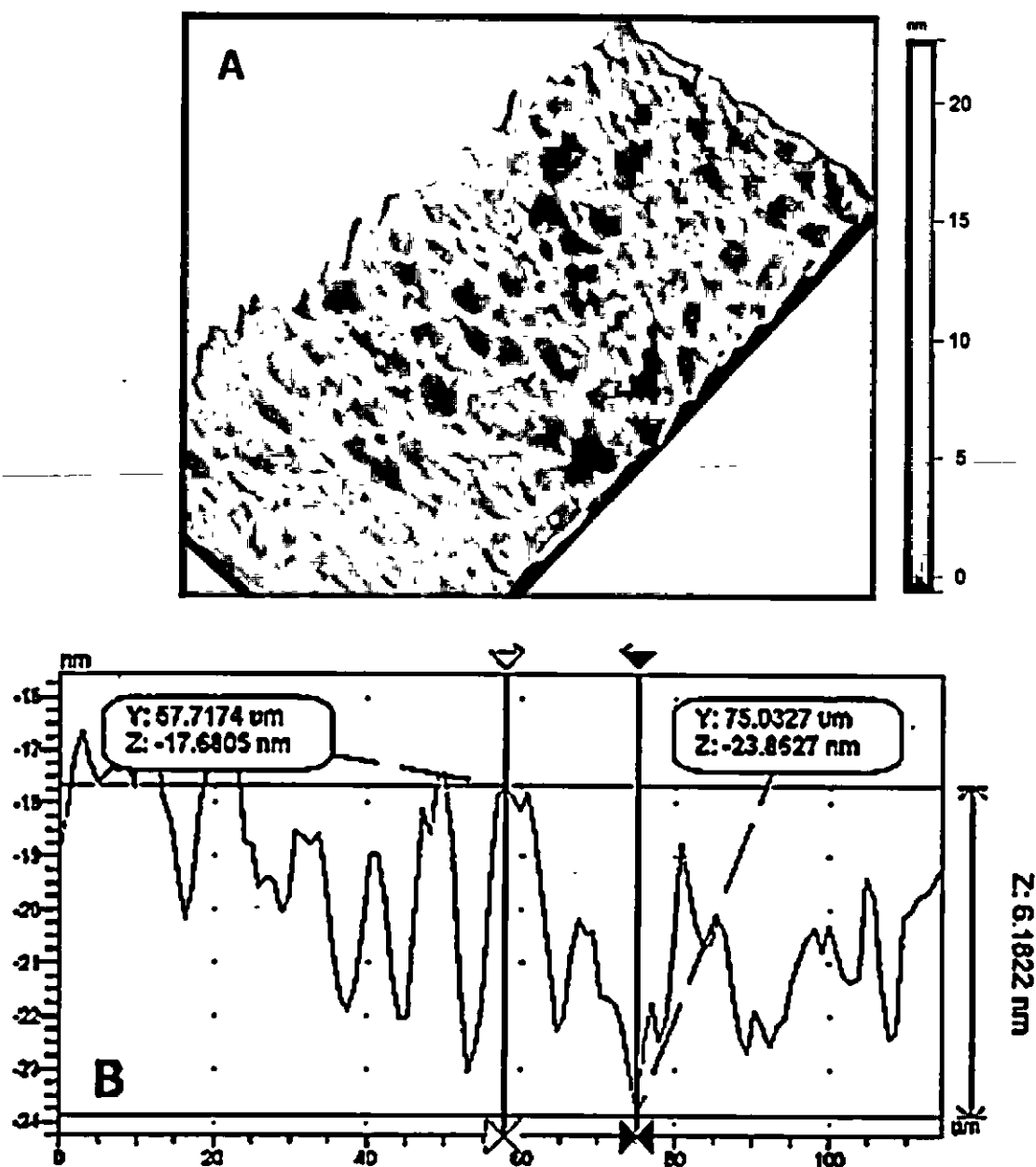


FIGURA 3

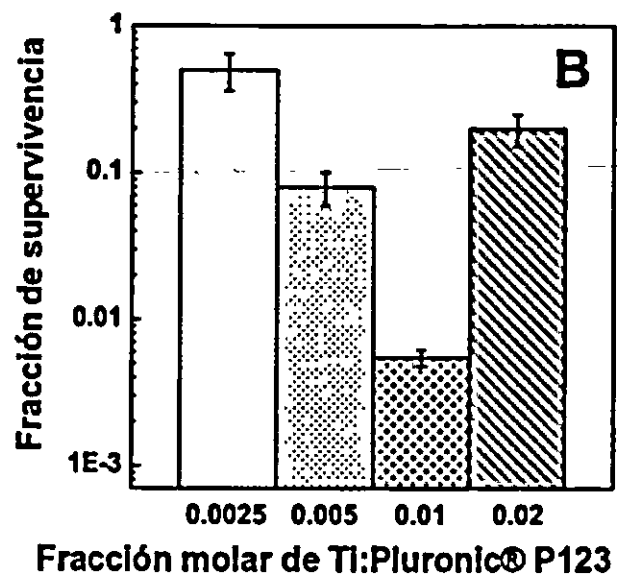
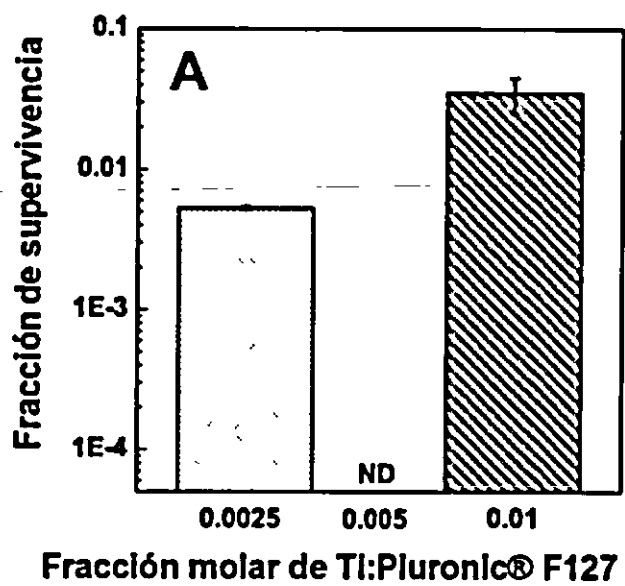


FIGURA 4

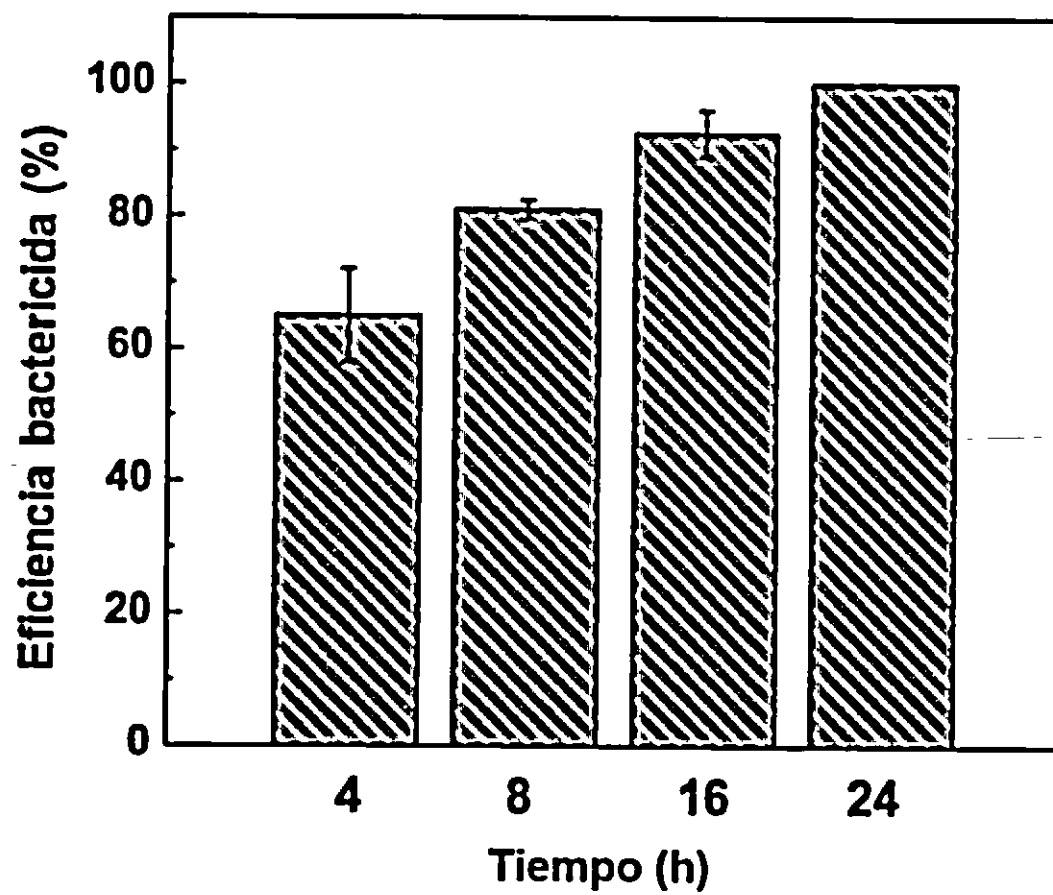


FIGURA 5

Resultados de pruebas de actividad antibacteriana de recubrimientos de dióxido de titanio cargados con Pluronic® F127 para cinco cepas de bacterias clínicamente significativas.

Cepas	UFC ^a 0 h	Recubrimientos cargados con F127		
		UFC 24 h	D% ^b	R ^c
<i>S. typhimurium</i>	2,28 x 10 ⁶	<10	>99,999	>6,43
<i>P. aeruginosa</i>	4,2 x 10 ⁶	<10	>99,999	>6
<i>E. coli</i>	6,2 x 10 ⁶	<10	>99,999	>5,69
<i>S. aureus</i>	3,4 x 10 ⁶	<10	>99,999	>3,74
<i>B. subtilis</i>	2,5 x 10 ⁶	1 x 10 ³	99,933	2,67

^a Se calcularon UFC a partir de la media de 3 relevamiento de UFC.

^b Reducción porcentual.

^c Valor de actividad antimicrobiana.

FIGURA 6

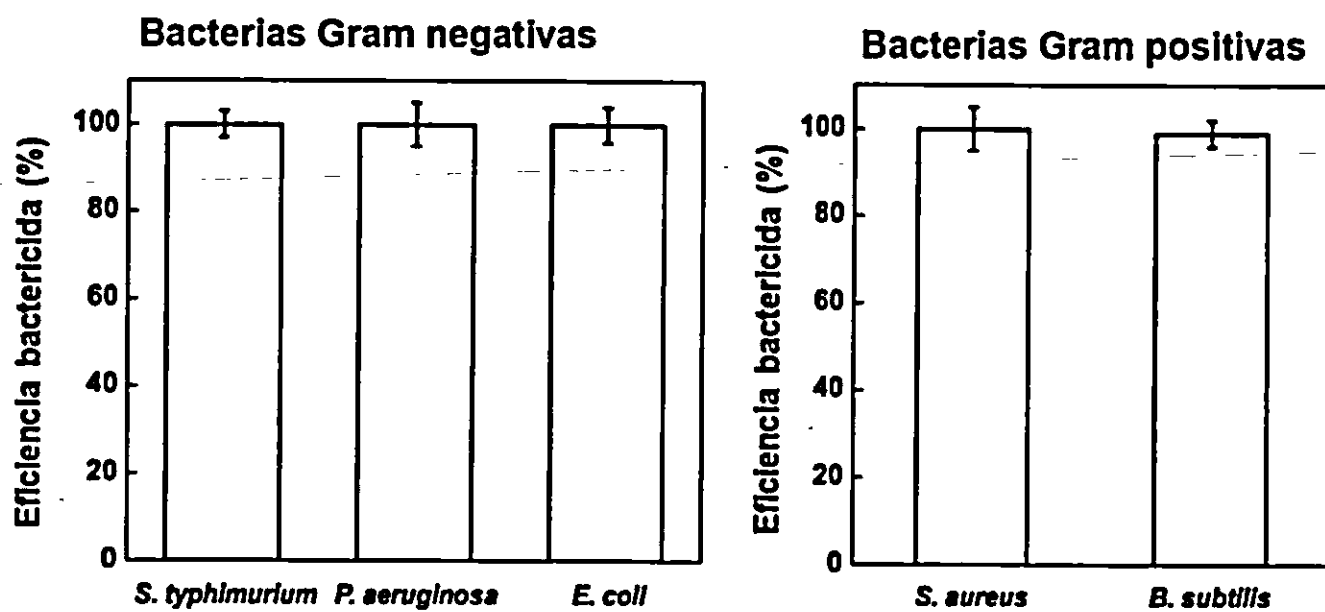


FIGURA 7

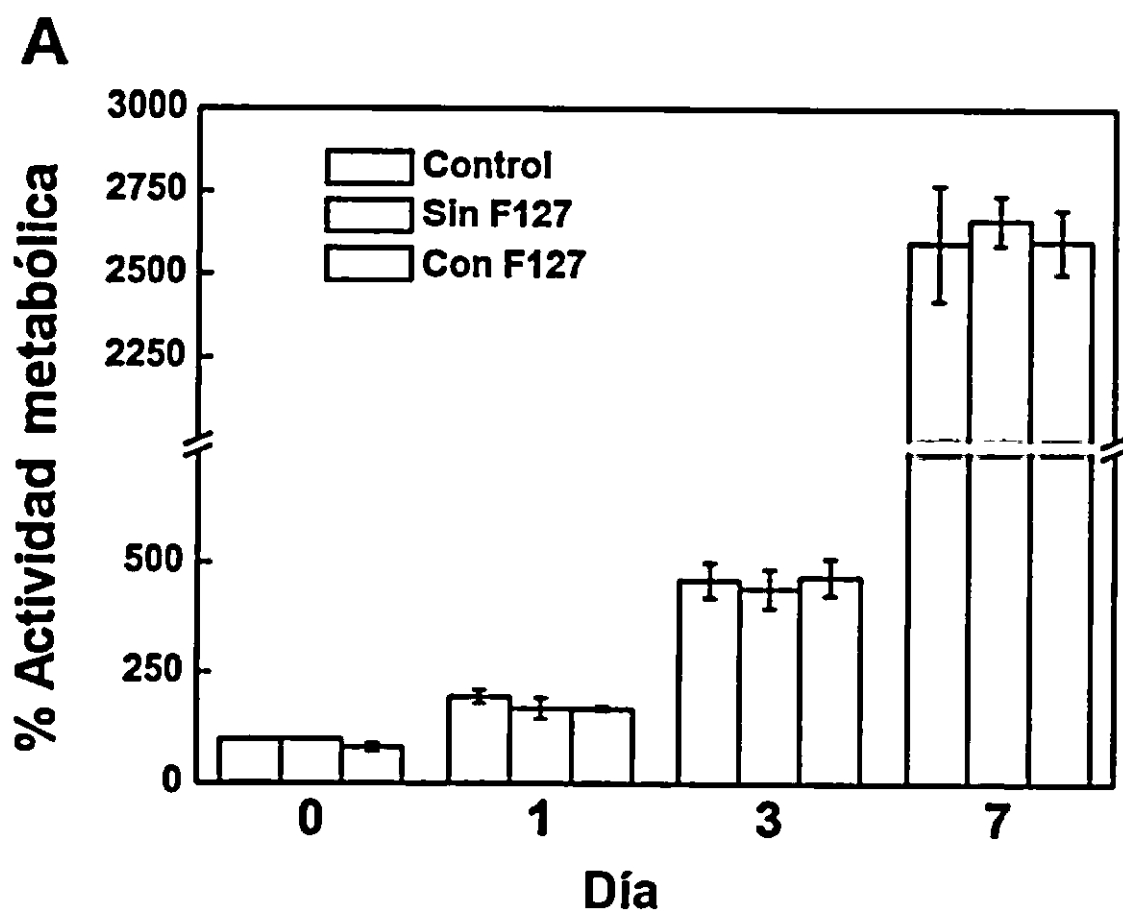


FIGURA 8



REPÚBLICA ARGENTINA

(10) PATENTE DE INVENCION

(11) RESOLUCION NUMERO: AR115129B1

(--) DISPOSICION GDE NUMERO: DI-2021-49-APN-ANP#INPI

(24) FECHA DE RESOLUCION: 31/03/2021

(--) FECHA DE VENCIMIENTO: 24/10/2038

(21) ACTA NUMERO: P20180103101

(22) FECHA PRESENTACION:24/10/2018

(51) INT.CL.7 : A61L 27/28; A61L 27/58

(30) PRIORIDAD CONVENIO DE PARIS

(54) TITULO :RECUBRIMIENTO BIOCOMPATIBLE HIBRIDO DE NANOPOLIMERO-OXIDO METALICO MESOESTRUCTURADO CON ACTIVIDAD BACTERICIDA INTRINSECA Y UN METODO PARA SU OBTENCION.

(71) TITULAR :

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET)
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA (CNEA)
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

---- CON RESIDENCIA EN :

GODOY CRUZ 2290 CABA, (C1425FQB), País AR
AV. DEL LIBERTADOR 8250 CABA, (C1429BNP), País AR
VIAMOTE 430/444 CABA, (C1153ABJ), País AR

(74) AGENTE :895



INPI

INSTITUTO NACIONAL
DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
ARGENTINA