

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

2020
Bogotá, D.C.,**No. 09-119370- -00005-0000**Fecha: 2012-08-09 16:25:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 519 TRASLADOINFORME Folios: 1Abogado
LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

ASUNTO	Radicación	09-119370
	Trámite	011
	Evento	378
	Actuación	519
	Oficio	
	Folios	012

0.14200

Patente de Invención	☐	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (Fase Nacional)	☐	Cap. I	☐
		Cap. II	☐

No. Solicitud Internacional PCT/US2008/060720
Fecha de Presentación Internacional 18 abril 2008

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 44 a 84	23 Octubre 2009
Reivindicaciones:	Folios 85 a 90	23 Octubre 2009
	Folios 150 a 154	22 Julio 2011
Dibujos:	Folios 92 a 100	23 Octubre 2009
Prioridad:	US 60/925.716	23 abril 2007

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486), y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Compuestos de estroncio que contienen composiciones de fibrina"

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de proporcionar composiciones para ayudar en la formación de hueso.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una composición para cicatrización ósea y crecimiento óseo en donde la composición comprende fibrina, trombina y un compuesto que contiene estroncio.

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): A61L 024/00, A61L 27/22, A61P 19/08;

Expediente 09-119370 1er Art 45

4. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El uso de las reivindicaciones 24 a 32 no es patentable, de acuerdo con el Art 14.

5. De la Solicitud de Patente

Titulo

El título no corresponde con el objeto de la solicitud la solicitud hace referencia a composiciones de al menos tres componentes como son fibrinógeno, trombina y un compuesto de estroncio, por lo cual se sugiere al Solicitante hacer la corrección necesaria.

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

La reivindicación 1 no es clara y concisa porque:

- No solo debe caracterizarse por sus componentes de manera general, sino también con las proporciones de estos.
- Se deben establecer inequívocamente los componentes como es el caso del compuesto de estroncio el cual no es definido y no es posible establecer su naturaleza química.
- No es adecuado caracterizar una composición por su uso.

De acuerdo con el capítulo descriptivo la invención esta dirigida a composiciones que además de tener como componentes principales fibrinógeno, trombina y

En todo el capítulo reivindicativo se utilizan los términos generales "compuesto que contiene estroncio" "microparticulado soluble", "proteínas asociadas a células" "proteínas derivadas de plasma", "proteasas", "inhibidores de proteasa", "coligando estroncio", etc., los cuales no son claros y no permite limitar el alcance de la invención puesto que hacen referencia a grupos funcionales o grupos farmacológicos que involucran un numero variado de compuestos con características químicas variadas. Se sugiere al solicitante establecer de manera inequívoca los componentes que hacen parte de la composición sin hacer referencia a nombres generales.

Las reivindicaciones 11 y 17 caracterizan la composición por un paso de transformación o mezcla de uno de sus componentes. Se recuerda al solicitante que tanto los componentes como la composición deben definirse por sí misma (estructura química, componentes y proporciones) y no debe hacerse referencia a procesos o pasos de elaboración. Se sugiere suprimir dichas reivindicaciones o hacer las aclaraciones respectivas.

Las reivindicaciones 10, 14 y 15 caracterizan la composición por la forma como se encuentra uno de sus componentes lo cual no es adecuado puesto que esto no hace parte de las características técnicas esenciales de la composición. Se sugiere establecer las características de dicho componente como característica secundaria dentro de la reivindicación principal, teniendo en cuenta que se debe definir inequívocamente el tipo de compuesto que contiene estroncio dentro de la composición.

Las reivindicaciones 6 y 23 hacen referencia a la forma de administración ó suministro de la composición reclamada, lo cual no la caracteriza correctamente

puesto que hace referencia a la forma de usarla, se sugiere eliminar dichas reivindicaciones.

La reivindicación 8 caracteriza la composición por el hecho de que esta se absorbe y se pone en contacto con un tejido. Lo anterior corresponde a un resultado a alcanzar puesto que no solo sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se sugiere reemplazarlo por las características esenciales, estructurales o funcionales, que contribuyen a la obtención de ese efecto.

De acuerdo a lo divulgado en el capítulo descriptivo en las realizaciones preferidas, una característica esencia de la invención consiste en la combinación de sales de estroncio con sales de calcio (fosfato de calcio), por tal razón se sugiere incluir dicha característica dentro de la reivindicación principal.

El capítulo reivindicatorio hace referencia a composiciones que comprenden además de trombina, fibrinógeno y un compuesto de estroncio otros componentes adicionales (plastificante de yodo, proteínas adicionales, coligandos, etc) sin embargo no se encuentra sustento para composiciones que contengan dichos componentes. Se sugiere limitar el alcance de la invención de acuerdo con las realizaciones prefereidas divulgadas en el capítulo descriptivo.

Se presenta una inconsistencia entre la reivindicación 9 y lo establecido por el solicitante en el capítulo descriptivo (folio 56), puesto que los componentes o agentes que inducen coagulación no son agentes adicionales sino por el contrario son alternativas a la trombina.

Descripción (Art 28 D 486)

La Descripción no es clara porque la información que contiene no permite que el la persona del oficio normalmente versada en la materia pueda desarrollar y reproducir la invención en cuanto a la generación de composiciones que contienen mas de los 4 componente (trombina, fibrinógeno, sales de calcio y compuestos de estroncio). Se requiere al Solicitante hacer las aclaraciones necesarias.

6. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad (23 abril 2007) y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	US 2001016646	Osteogenic devices and methods of use thereof for repair of endochondral bone, osteochondral and chondral defects	23 agosto 2001
D2	US 200410241314	Strontium-substituted apatite coating	02 diciembre 2004
D3	Biomaterials Volume 28, Issue 2, Pags 3171–3181	The effect of strontium incorporation into CaSiO ₃ ceramics on their physical and biological properties	05 abril 2007

D1 divulga dispositivos osteogénicos y métodos para la reparación de huesos y defectos del cartilago, dichos dispositivos contienen composiciones que promueven la formación acelerada de tejido.

URL:http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?DB=EPODOC&II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20010823&CC=US&NR=2001016646A1&KC=A1

D2 divulga método para preparar una composición implantable con un agente bioactivo de la unión estroncio- apatita. Dicha composición que comprende (i) los iones estroncio, (ii) los iones de calcio, (iii) los iones de fosfato, y (iv) un vehículo líquido.

URL:http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=US&NR=2004241314A1&KC=A1&FT=D&ND=3&date=20041202&DB=EPODOC&locale=en_EP

D3 divulga el efecto de la combinación de sales de calcio con sales de estroncio en la regeneración ósea (Folios 164-168)

7. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 1 consiste en “una composición que comprende fibrinógeno, trombina y un compuesto que contiene estroncio para uso en cicatrización ósea o crecimiento óseo”.

Frente a D1 y D2

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Composición para uso en cicatrización ósea o crecimiento óseo	Composición para uso en cicatrización ósea o crecimiento óseo	Composición para uso en crecimiento óseo
fibrinógeno	fibrinógeno	No menciona
trombina	trombina	No menciona
compuesto que contiene estroncio	Sales de calcio	Combinación estroncio con sales de calcio

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque:

D1 divulga composiciones y métodos para el tratamiento de defectos en cartílago y hueso (resumen). Dichas composiciones comprenden trombina, fibrinógeno y fosfato de tri-calcio (párrafo 0129) las cuales se reabsorben y mejoran la formación de hueso luego de su implantación (párrafo 0124-0131)

Asimismo, se divulga que la combinación de fibrinógeno y trombina tiene características de agente gelificante (párrafo 0074-0075) y que en presencia del una matriz de calcio (fosfato) forman una masilla moldeable de tipo gel (párrafo 0120 - 0121) que puede inyectarse a la zona deseada (reivindicación 40). Por otro lado se divulga que las partículas de calcio tienen una dimensión de partícula de 50-2000um (párrafo 0129 reivindicaciones 14 y 15).

Adicionalmente dichas composiciones pueden contener proteínas extracelulares como son fibronectina, factores de coagulación (párrafo 0122) y proteínas morfo génicas (reivindicación 21) y agentes de tipo plastificante como son polialcoholes, polisacáridos, etc.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición divulgada en D1 consiste en la presencia de un compuesto que contiene estroncio adicionalmente a los componentes fibrinógeno, trombina y sales de calcio.

El efecto que logra el incluir la presencia de un compuesto de estroncio dentro de las composiciones que contienen fibrinógeno, trombina y sales de calcio, es que se incrementa la resistencia mecánica del hueso.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿cómo modificar las composiciones divulgadas en D1 para el manejo de lesiones y defectos óseos para conseguir un incremento en la resistencia mecánica del hueso generado?

Por su lado el documento D2 divulga composiciones para mejorar los defectos óseos y método para preparar una composición implantable con un agente bioactivo obtenido por la unión estroncio- apatita. Dicha composición que comprende (i) los iones estroncio, (ii) los iones de calcio, (iii) los iones de fosfato, y (iv) un vehículo líquido (resumen, reivindicación 1) tiene como efecto principal ser agente mejorador de la formación de hueso (columna 4 líneas 18-24) y puede combinarse con agentes biológicos que incluyen factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular (columna 6, líneas 12 a 19) y agentes calcimiméticos como la osteocalcina (columna 6, línea 22).

De igual manera, D2 divulga la combinación de cloruro de estroncio con apatita (sales de calcio) luego de la mezcla de estos dos componentes de tal manera que se forma sal de los dos compuestos con una relación entre estroncio y calcio 1:3 o 1:10 (columna 4, líneas 28-29; reivindicación 1 y 16). Dentro de la composición la concentración de iones estroncio se encuentra entre 0.5nM y 5mM (columna 5, líneas 25-27, reivindicación 2), por lo que la cantidad de estroncio, calcio e iones fosfato dentro de la composición determina la funcionalidad y la resistencia de la cubierta dentro del implante (ejemplo 1). Si bien es cierto que el documento D2 no divulga una matriz gelificable, si establece la pertinencia de la mezcla de estroncio y calcio para mejorar la resistencia y aplicabilidad del implante óseo para animales, humanos, etc.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, que pretenda obtener composiciones para uso en cicatrización ósea o crecimiento óseo que conozca el estado de la técnica, estaría motivada a incluir la mezcla entre estroncio y calcio, como agentes que dan mayor resistencia mecánica al hueso, divulgada en el documento D2, dentro de las composiciones divulgadas en el documento D1 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 2, 3, 6 a 23 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

Frente a D1 y D3

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1		D3
Composición para uso en cicatrización ósea o crecimiento óseo	Composición crecimiento óseo	para	No menciona
fibrinógeno	fibrinógeno		No menciona
trombina	trombina		No menciona
compuesto que contiene estroncio	Sales de calcio		Combinación estroncio con sales de calcio

Los documentos D1 y D3 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque:

D1 divulga composiciones y métodos para el tratamiento de defectos en cartilago y hueso (resumen). Dichas composiciones comprenden trombina, fibrinógeno y fosfato de tri-calcio (párrafo 0129) las cuales se reabsorben y mejoran la formación de hueso luego de su implantación (párrafo 0124-0131)

Asimismo, se divulga que la combinación de fibrinógeno y trombina tiene características de agente gelificante (párrafo 0074-0075) y que en presencia del una matriz de calcio (fosfato) forman una masilla moldeable de tipo gel (párrafo 0120 - 0121) que puede inyectarse a la zona deseada (reivindicación 40). Por otro lado se divulga que las partículas de calcio tienen una dimensión de partícula de 50-2000um (párrafo 0129 reivindicaciones 14 y 15).

Adicionalmente dichas composiciones pueden contener proteínas extracelulares como son fibronectina, factores de coagulación (párrafo 0122) y proteínas morfo génicas (reivindicación 21).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y la composición divulgada en D1 consiste en la presencia de un compuesto que contiene estroncio adicionalmente a los componentes fibrinógeno, trombina y sales de calcio.

El efecto que logra el incluir la presencia de un compuesto de estroncio dentro de las composiciones que contienen fibrinógeno, trombina y sales de calcio, es que se incrementa la resistencia mecánica del hueso.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿cómo modificar las composiciones divulgadas en D1 para el manejo de lesiones y defectos óseos para conseguir un incremento en la resistencia mecánica del hueso generado?

Sin embargo el documento D3 da solución a dicho problema técnico pues divulga estudios que demuestran la pertinencia y el uso de sales combinadas de estroncio y calcio (sales de Sr-CaSiO_3) como material bioactivo para la regeneración ósea, incremento de la actividad de osteoblastos y la estimulación de tejido óseo (Folio 164, Ítem 1). Asimismo, se divulga que el aumento en la concentración de iones estroncio genera un aumento en la densidad de las sales de calcio lo que lleva a una mayor resistencia del hueso (osteocitos) en las pruebas experimentales y a la disminución de la degradación y disolución de las sales de calcio (Folio 166, ítem 4; folio 168, ítem 5)

La reivindicación es obvia, porque la persona del oficio normalmente versada en la materia enfrentada al problema de cómo modificar las composiciones divulgadas en D1 para el manejo de lesiones y defectos óseos para conseguir un incremento en la resistencia mecánica del hueso generado?, incluiría sales combinadas de estroncio y calcio (sales de Sr-CaSiO_3) como material bioactivo para la regeneración ósea que se revelan en D3, dentro de las composiciones que se enseñan en D1, logrando de esta forma la composición objeto de esta solicitud.

Por lo cual la composición, de la Reivindicación 1 carece de Nivel Inventivo.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 2, 6 a 23 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

8. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Item	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US 2001016646	2, 6 a 23	Nivel Inventivo
D2	US 200410241314	2, 6 a 23	Nivel Inventivo
D3	<u>Biomaterials</u> Volume 28, Issue 2, Pags 3171-3181	2, 6 a 23	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante y presentarla por escrito

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 04 AGO. 2012

Elaborado por: Ana Delia Pinzón García
Revisado por: Consuelo Leguizamón Leguizamón 



The effect of strontium incorporation into CaSiO₃ ceramics on their physical and biological properties

Chengtie Wu, Yogambha Ramaswamy, Danielle Kwik, Hala Zreiqat*

Biomaterials and Tissue Engineering Unit, Department of Biomedical Engineering, School of CMME,
The University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia

Received 13 January 2007; accepted 2 April 2007
Available online 5 April 2007

Abstract

CaSiO₃ ceramics have been regarded as a potential bioactive material for bone regeneration. Strontium (Sr) as a trace element in human body has been found to have beneficial effects on bone formation. The aims of this study was to incorporate Sr into CaSiO₃ bioactive ceramics and to investigate their effects on phase transition, sintering property, apatite formation ability, ionic dissolution, and human bone-derived cells (HBDC) proliferation. Sr-containing CaSiO₃ (Sr-CaSiO₃) ceramics at various concentrations (0–10% Sr) were prepared. The incorporation of Sr into CaSiO₃ promoted the phase transition from β to α -CaSiO₃ and enhanced ceramic densification but did not alter the sintering and ability of apatite formation in SBF. The ionic dissolution rate of the Sr-CaSiO₃ decreased compared to the CaSiO₃. The addition of Sr decreased pH value in SBF. The effect of Sr-CaSiO₃ extracts, carried out according to the International Standard Organization, on HBDC proliferation was evaluated. At high extract concentration (100 and 200 mg/ml), CaSiO₃ was found to stimulate HBDC proliferation; however, the incorporation of Sr into CaSiO₃ stimulated HBDC proliferation even at low extract concentration (ranging from 12.5 to 25 to 50 mg/ml). Our results indicate that Sr-CaSiO₃ ceramics improved the physical and biological properties of the pure CaSiO₃ ceramics.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Sr-CaSiO₃; Phase transition; Apatite-formation ability; Dissolution; Proliferation

1. Introduction

CaSiO₃ ceramics are regarded as potential bioactive materials for bone tissue regeneration due to their osseointegration properties [4–6]. A major drawback of the CaSiO₃ ceramics is their high dissolution and degradation rate leading to a high pH value in the surrounding environment [5,6] which can disadvantage cell growth thereby affecting their osseointegration ability [7]. Strontium (Sr), a divalent cation, is used for treatment of osteoporosis [8,9]. Sr was found to induce osteoblast activity [10–13] by stimulating bone formation and reducing bone resorption [11–16]. It has great affinity to bone [17] and is incorporated into it by two mechanisms: (a) surface exchange involving the incorporation of Sr into

the crystal lattice of the bone mineral or (b) ionic substitution whereby Sr is taken up by ionic exchange with bone Ca. The radius of Sr ions (1.13 Å) is larger than that of Ca ions (1.00 Å) [18], which will occupy more space in crystal lattice and inhibit the movement and release of other ions and thereby decrease the dissolution rate of CaSiO₃. It was reported that Sr ions were used as sintering additives to improve PbTiO₃ ceramic density [19] and the improvement of ceramic density would decrease the dissolution rate of ceramics [20].

We postulated that the incorporation of Sr ions into CaSiO₃ will improve both the physical and biological properties of CaSiO₃. Our present study demonstrated that the incorporation of Sr into CaSiO₃ resulted in its phase transition from β to α -CaSiO₃, stimulated the densification of the CaSiO₃ and decreased its ionic dissolution rate. Furthermore, Sr incorporation into CaSiO₃ maintained its ability for apatite formation and stimulated HBDC proliferation.

2. Materials and methods

2.1. Preparation and characterization of Sr-CaSiO₃ ceramics

Sr-CaSiO₃ powders containing 0, 1, 2.5, 5 and 10 mol% of Sr were synthesized by chemical precipitation method according to our previously published study [21]. Sr-CaSiO₃ powders were sieved to 250 mesh and analyzed using differential thermal analysis (DTA). For the preparation of ceramic disks, Sr-CaSiO₃ powders were mixed with 10 wt% poly(vinyl alcohol) (PVA) solution (PVA solution/powders = 1/9). The mixture was uniaxially pressed at 200 MPa to get Sr-CaSiO₃ green disks with a dimension of 12.15 × 2 mm. Subsequently, the green disks were sintered at 1100 and 1250 °C for 3 h with a heating rate of 2 °C/min to obtain the ceramic disks.

The sintered Sr-CaSiO₃ ceramics disks were analyzed using X-ray diffraction (XRD, Siemens D5000, Germany) and scanning electron microscopy (SEM, Philips XL 30 CP, The Netherlands). The apparent density D of the ceramics was measured according to Archimedes' principle using the following formulation: $D = M_2/(M_2 - M_1)$, where M_1 is the weight of sample in air, M_2 the weight of sample with water, and M_3 the weight of sample suspended in water. The relative density Rd was calculated using the formulation $Rd = D/Td$, where D is the apparent density of ceramics and Td the theoretical density of the materials.

2.2. Ability of Sr-CaSiO₃ ceramics to form an apatite layer

SBF containing ion concentrations similar to those in human blood plasma was prepared according to the method described by Kokubo [22]. Briefly, reagent-grade CaCl₂, K₂HPO₄, 3H₂O, NaCl, KCl, MgCl₂·6H₂O, NaHCO₃, and Na₂SO₄ were dissolved in distilled water and pH adjusted to 7.4. Sr-CaSiO₃ ceramic disks were soaked in SBF at 37 °C for 1, 3, 7 and 14 d, and the ratio of disc surface area to solution volume of SBF was 0.1 cm²/ml. After soaking, the disks were dried at 100 °C for 1 d and characterized using XRD and SEM. The soaked disks were fixed in polymethylmethacrylate (PMMA) and sections were cut using a diamond saw (Eckart 300C2, Eckart Apparaturen, Germany) and subsequently ground and polished with an Exakt 400 CS Micro Grinding System (Eckart Apparaturen, Germany) before analyzing using SEM and energy dispersive spectrometer (EDS, Philips XL 30 CP, The Netherlands).

2.3. Dissolution rate of Sr-CaSiO₃ ceramics in SBF

The changes in concentrations of Ca, Si and Sr ions in SBF after soaking were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Perkin Elmer Optima 3000DV, USA), and the changes in pH value of the solution were determined using an electrode type pH meter. Based on the fact that there is no Sr in SBF before soaking, the dissolution ratio d of the Sr-CaSiO₃ ceramics at different time periods was calculated by the following equation: $d = (c_{Sr,t} - c_{Sr,0})/c_{Sr,0} \times 100\%$, where $c_{Sr,t}$, $c_{Sr,0}$ and mg represent the Sr concentration in SBF (mg/ml), volume of SBF (ml) and Sr content (mg) of the samples soaked in SBF, respectively.

2.4. Human bone-derived cells (HBDC) isolation and culture

HBDC were grown from small pieces of scratch bone harvested from healthy patients under 15 years of age [23]. In brief, bone was immersed into about 1 mm pieces, washed several times in phosphate buffered saline (PBS), and digested for 90 min at 37 °C with 0.02% (w/v) trypsin (Sigma) in PBS. Digested cells were cultured in α MEM α Essential Medium (α -MEM, Gibco Laboratories), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco Laboratories), 2 mM glutamine (Gibco Laboratories), 5 mM Hanks buffer (Gibco Laboratories), 2 mM sodium pyruvate, 50 mg/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Gibco Laboratories) and 0.1 μ M ascorbic acid phosphate magnesium salt (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan). The digested cells were cultured in 75 cm² flasks at 37 °C in a CO₂ incubator until it was confluent to about 90%. The confluent cells were

trypsinized and used for the proliferation assay. Permission to use discarded human tissue was granted by the Human Ethics Committee of the University of Sydney.

2.5. The effect of Sr-containing ionic products from Sr-CaSiO₃ on HBDC proliferation

The Sr-CaSiO₃ powder extract was diluted in full culture medium according to International Standard Organization (ISO) EN 10993-5 [24]. The dissolution extracts of ceramics were prepared by adding Sr-CaSiO₃ powders to serum free α -MEM culture medium at a ratio of 200 mg/ml (powder to medium). After incubation at 37 °C for 24 h, the mixture was centrifuged and the supernatant was collected. Serial dilutions of extracts (100, 50, 25, 12.5 and 6.25 mg/ml) were prepared using serum-free α -MEM medium (without α -glutamine or ascorbic acid). Subsequently, the diluted extracts were sterilized using 0.22 μ m filter and used in HBDC cell culture experiments. The same concentration of the diluted extracts was measured by ICP-AES (Table 1).

HBDC was seeded at a density of 1×10^3 cells/well into 96-well plate and incubated for 24 h. The culture medium was then removed and replaced by 80 μ L of α -MEM medium supplemented with 20% FCS. The culture medium supplemented with 10% FCS without addition of diluted extracts was used as a blank control (Blank), and 80 μ L solution of 0.2% Triton X-100 and 50 μ L of α -MEM medium supplemented with 20% FCS was used as a negative control (Ctrl-). Cells were then incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 1, 3, and 7 d.

Visible cell numbers were evaluated at appropriate time intervals (1, 3, and 7 d) using MTS assay (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The MTS (tetrazolium) compound is a soluble version of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTS). It is reduced by cells into a colored formazan product that is soluble in culture medium. The quantity of formazan product is directly proportional to the number of living cells in culture.

At the predetermined time point, 100 μ L of 0.5 mg/ml MTS solution was added in each well and was incubated for 4 h at 37 °C to take up the dye. The reaction was stopped by the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance of the formazan was read at 490 nm using an ELISA plate reader and a software Accu/MTS. Results were expressed as absorbance reading from each well minus the optical density value of blank wells.

2.6. Statistical analysis

Results were expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) for all experiments and were analyzed using one-way ANOVA with a post-hoc test. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization of Sr-CaSiO₃ ceramics

The incorporation of Sr into CaSiO₃ ceramics resulted in a phase transition of CaSiO₃ from β to α as shown in the XRD results in Fig. 1, the transition was more prominent with increased Sr concentration. At 1% Sr content, β -CaSiO₃ phase was obtained, while at 2.5% Sr there was a mixed composition of both α -CaSiO₃ and β -CaSiO₃ phases. When Sr content increased to 5% and 10%, only α -CaSiO₃ phase existed. DTA analysis showed that with an increase in Sr content, the temperature of phase transition from β to α phase decreased (Fig. 2). The XRD patterns of the Sr-CaSiO₃ ceramics sintered at 1250 °C are shown in Fig. 3. Only α -CaSiO₃ peaks (Standard cards no. JCPD

* Corresponding author. Tel.: +61 2 9351 2807 fax: +61 2 9351 7660.
E-mail address: h.zreiqat@sydney.edu.au (H. Zreiqat).

164

Table 1
The Ca, Si and Sr ion concentrations of Sr-CaSiO₃ extracts (mM)

Materials	Ions	Extract concentrations (mg/mL)					
		Blank	12.5	25	50	100	200
CaSiO ₃	Ca	2.43	1.42	1.55	1.81	3.35	5.40
	Si	0	0.09	0.18	0.35	0.66	1.37
	Sr	0	0	0	0	0	0
Sr 1%-CaSiO ₃	Ca	2.43	1.42	1.55	1.81	2.32	3.44
	Si	0	0.09	0.18	0.19	0.38	0.76
	Sr	0	0.002	0.003	0.006	0.013	0.025
Sr 2.5%-CaSiO ₃	Ca	2.43	1.45	1.61	1.93	2.56	3.84
	Si	0	0.07	0.13	0.27	0.55	1.0
	Sr	0	0.003	0.007	0.013	0.027	0.054
Sr 5%-CaSiO ₃	Ca	2.43	1.41	1.53	1.78	2.27	3.24
	Si	0	0.05	0.10	0.20	0.39	0.78
	Sr	0	0.007	0.015	0.030	0.059	0.118
Sr 10%-CaSiO ₃	Ca	2.43	1.44	1.59	1.89	2.49	3.70
	Si	0	0.07	0.14	0.29	0.57	1.15
	Sr	0	0.014	0.028	0.057	0.114	0.227

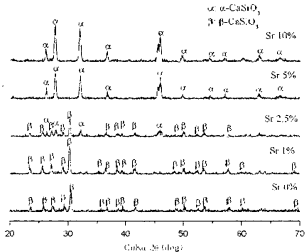


Fig. 1. XRD patterns of Sr-CaSiO₃ ceramics sintered at 1100 °C.

31-0300) were evident, which indicates that Sr-CaSiO₃ ceramics maintain α-CaSiO₃ structure at Sr concentrations of 1%, 2.5%, 5% and 10%. The effect of Sr contents on the relative density is shown in Fig. 4, where low Sr contents (1% and 2.5%) significantly enhanced the densification of CaSiO₃ ceramics ($p < 0.05$) and as Sr concentration increased (5% and 10%) no obvious effect was found on the densification.

3.2. Apatite-formation ability of Sr-CaSiO₃ ceramics

The XRD patterns of Sr-CaSiO₃ ceramics after soaking in SBF for 14 d are presented in Fig. 5. Only the characteristic peaks of apatite (standard cards no JCPD

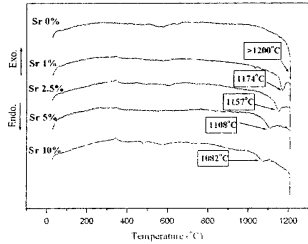


Fig. 2. DSC curves of Sr-CaSiO₃ with different Sr contents.

24-0033) existed in the XRD pattern and there was no difference in the intensity of peaks with different Sr contents in CaSiO₃ ceramics. SEM micrographs showed an obvious apatite layer is formed on the Sr-CaSiO₃ ceramics (Fig. 6). However, their microstructure differed significantly with the different Sr concentrations used (Fig. 6). A smooth apatite layer is formed on pure CaSiO₃ ceramics and the apatite microcrystals are not evident (Fig. 6(a)). When Sr contents of 1%, to 2.5% were used, the apatite microcrystals had a lath-like structure where the crystal boundaries were more evident (Figs. 6(b) and (c)). In contrast, lath-like structure of apatite was formed at 5% and 10% Sr contents (Figs. 6(d) and (e)). The SEM images and EDS analysis of the cross-section of Sr-CaSiO₃

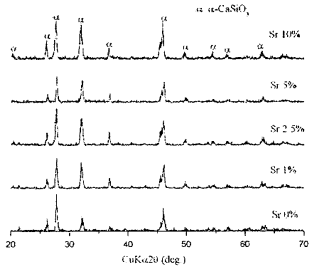


Fig. 3. XRD patterns of Sr-CaSiO₃ ceramics sintered at 1250 °C.

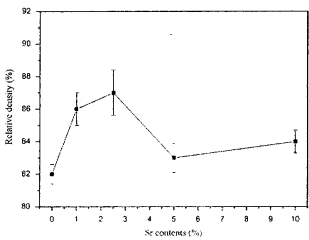


Fig. 4. The effect of Sr contents on the relative density of CaSiO₃ ceramics.

ceramics after soaking in SBF for 14 d are shown in Fig. 7. Silica-rich layer was formed on the different Sr containing CaSiO₃ ceramics with an apatite layer deposited on the silica-rich layer. The thickness of the formed apatite on different Sr containing CaSiO₃ ceramics was similar and varied within the range of 20–30 μm.

3.3. Ion release, pH values, and weight loss of Sr-CaSiO₃ ceramics in SBF

The ion release of Sr-CaSiO₃ ceramics in SBF solution is shown in Fig. 8. The concentrations of Ca and Sr ions in pure CaSiO₃ soaked in SBF solution were higher than those of Sr-containing CaSiO₃. Sr-CaSiO₃ ceramics at 2.5% Sr concentration resulted in the lowest Si ion release (Fig. 8(a)). A positive correlation existed between the

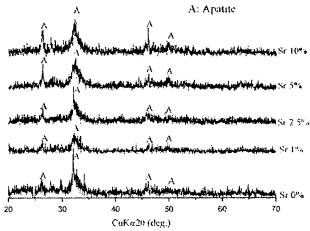


Fig. 5. XRD patterns of Sr-CaSiO₃ ceramics after soaking in SBF for 14 d.

release of Sr ions concentrations in SBF and the Sr contents in Sr-CaSiO₃ ceramics (Fig. 8(c)). The weight loss of Sr-CaSiO₃ ceramics was calculated according to the Si concentrations in SBF and was found to increase with an increase of soaking time (Fig. 8(d)). Furthermore, the Sr-containing CaSiO₃ ceramics decreased the weight loss, compared to CaSiO₃. CaSiO₃ containing 2.5% Sr resulted in the lowest weight loss (Fig. 8(d)). pH value of Sr-containing CaSiO₃ ceramics-soaked solution was significantly lower compared to CaSiO₃ ceramics (Fig. 9). The pH value increased in the first 6 d of soaking the disks (both modified and unmodified with Sr) in SBF, followed by a decrease at 7 and 8 d of soaking and this trend reversed (increased) at 9 d of soaking. Interestingly, the pH values of CaSiO₃ containing 5% and 10% Sr are comparable but lower than those of CaSiO₃ containing 1% and 2.5% Sr (Fig. 9).

3.4. The effect of Sr-CaSiO₃ extracts on HBDC proliferation

The effect of ions released from Sr-CaSiO₃ at different concentrations on HBDC proliferation was evaluated at 1, 3, and 7 d. HBDC proliferation was comparable when cells were cultured with the different concentration of extracts for 1 and 3 d (Fig. 10). However, at day 7, a significant increase in HBDC proliferation was observed (Fig. 10). CaSiO₃, with no Sr stimulated cell proliferation at extract concentration range 100–200 mg/mL (Fig. 10(a)) compared to the blank control and had no stimulatory effect on cell proliferation at lower extract concentration range (12.5–50 mg/mL). However, with the incorporation of Sr into CaSiO₃, HBDC proliferation increased significantly even at lower extract concentration range (12.5–50 mg/mL), compared to CaSiO₃ (Figs. 10(b) (c)).

Ionic concentrations of Ca, Si and Sr increased with an increase in extract concentrations (Table 1). When extracts of CaSiO₃ were added to the culture, only high concentration

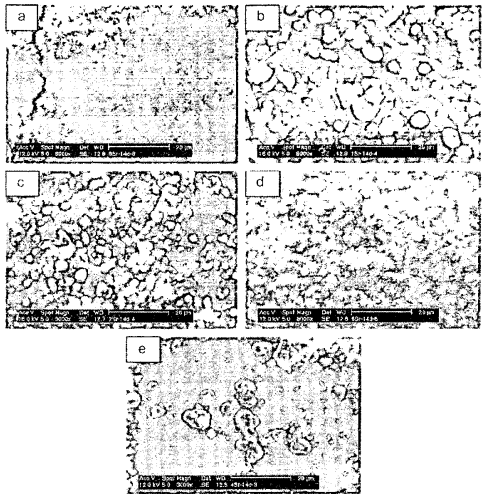


Fig. 6. SEM micrographs of Sr-CaSiO₃ ceramics after soaking in SBF for 14 d: (a) Sr 0%, (b) Sr 1%, (c) Sr 2.5%, (d) Sr 5% and (e) Sr 10%.

range of Ca (3.35–5.40 mm) and Si (1.37–2.30 mm) resulted in enhanced HBDC proliferation compared to the blank control. However, lower concentration of Ca (1.53–2.56 mm) and Si (0.69–0.69 mm) resulted in enhanced HBDC proliferation when Sr was incorporated into the CaSiO₃ (Table 1 and Fig. 10).

4. Discussion

The results of this study demonstrate that the incorporation of Sr into CaSiO₃ ceramics changed its phase composition, which was regulated by the sintering temperature used. At 1100 °C, increase of Sr contents resulted in phase transition from β -CaSiO₃ to α -CaSiO₃. In addition, the temperature of phase transition decreased with increase of Sr contents. Previously, it was shown that the incorporation of some foreign ions in TiO₂ can stimulate the phase transition from anatase to rutile, which was attributed to the formation of oxygen vacancies that enhanced the transport of atoms and accelerated phase

transition [25]. Recently, we showed that the incorporation of Sr increased the crystal dimension [21], which may be responsible for enhancing the transport of atoms and stimulating the phase transition of CaSiO₃. In the present study, we found that the increase in sintering temperature to 1250 °C resulted in the formation of a phase irrespective of the Sr concentration incorporated into the CaSiO₃, indicating that the sintering temperature is crucial in maintaining a pure α -phase for the Sr-modified CaSiO₃ ceramics. Although Sr contents (0–10%) have no obvious effect on the phase composition at this sintering condition, Sr contents modulated the density of CaSiO₃ ceramics. This is in agreement with the studies by others [19] where Sr²⁺ was used as a sintering additive to stimulate the densification of PbTiO₃ ceramics. In the present study, the densification of CaSiO₃ ceramics was increased when 1% and 2.5% Sr was incorporated into CaSiO₃ ceramics, while at higher concentrations of Sr (5% and 10%), no obvious effect was seen on the densification of the ceramics. Previously, Cho et al. [26] found that Cd²⁺ as a sintering

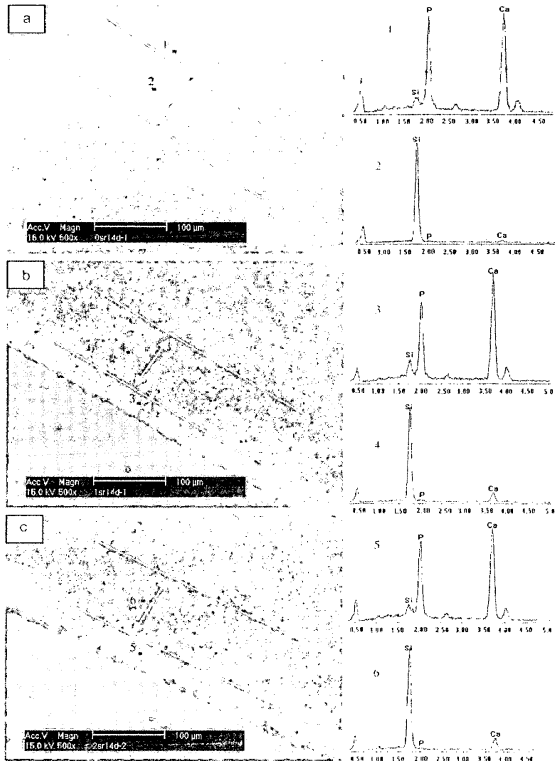


Fig. 7. SEM micrographs and EDS point analysis of the cross-section of Sr-CaSiO₃ ceramics after soaking in SBF for 14 d: (a) Sr 0%, (b) Sr 1% and (c) Sr 5%. Arrows stands for the apatite layer and Sr-rich layer. The ratio of Ca/P is 1.61 (Point 1), 1.59 (Point 3), 1.56 (Point 5), 1.54 (Point 7) and 1.51 (Point 9).

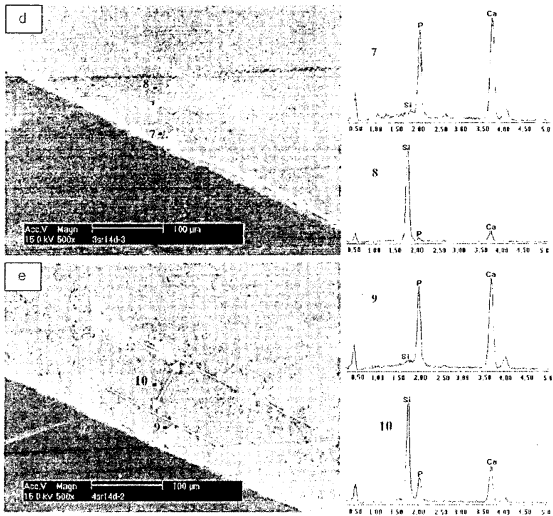


Fig. 7. (Continued)

additive promoted the densification of $(\text{Pb}_{0.5}\text{Ti}_{0.5})\text{ZrO}_3$ ceramics through the replacement of Pb^{2+} by Cd^{2+} . Therefore it is reasonable to speculate that the mechanisms by which Sr induced densification of the CaSiO_3 ceramics in the present study, may be related to the fact that Sr ions (1.13 Å) possesses a larger radius than Ca (1.00 Å) as shown previously [18], which causes an increase in crystal dimension, thereby enhancing the transport of atoms and accelerates the densification of CaSiO_3 ceramics. However, at 5% and 10% concentration, Sr can cause a further increase in crystal dimension leading to the formation of a loose structure which results in a decreased density, compared with those of 1% and 2.5% Sr containing CaSiO_3 ceramics.

CaSiO_3 ceramics have been proposed as potential materials for bone tissue regeneration, since they proved to be bioactive, degradable and biocompatible [1–3]. However, their high degradation rate, leading to a high

pH value environment [5,6], may limit their biological application [7]. In our study, the incorporation of Sr in CaSiO_3 decreases Si ion concentrations in SBF and HBDC culture medium, indicating that the dissolution of CaSiO_3 decreases. Sr enhances the density of CaSiO_3 ceramics and the higher density will decrease ion degradation [9], on the other hand, Sr possesses a larger radius than Ca, which occupies more space in crystal lattice and inhibits the movement and release of Si ions and thereby decreases the dissolution rate of CaSiO_3 . In addition, grain structure and grain boundary have been previously shown to affect ceramics dissolution [27–30], whereby compact grain structure with no obvious defects decreased ceramic dissolution [27–29], and bioglass incorporation into hydroxyapatite ceramics strengthened the grain boundaries and inhibited their dissolution [30]. In the present study, we used Sr as sintering additives, and our results convincingly indicated the ability of Sr to promote grain sintering and

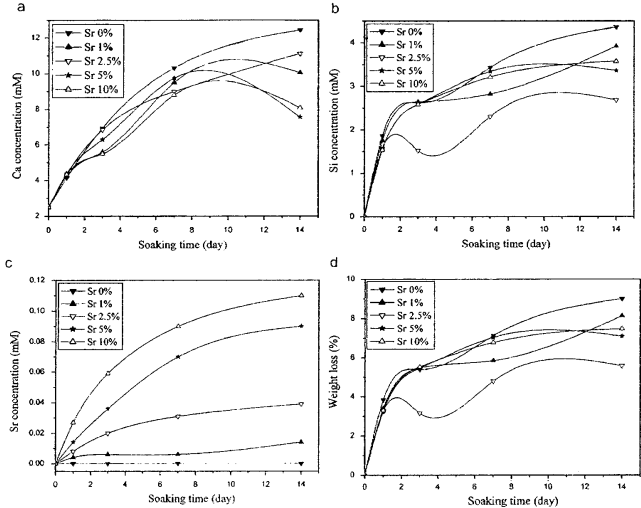


Fig. 8. The effect of Sr contents in CaSiO_3 ceramics on the Ca (a), Si (b), and Sr (c) ion release, and weight loss of ceramics (d) in SBF; lines joining the points only.

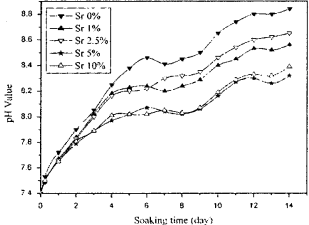


Fig. 9. The change of pH value in SBF solution after soaking for various time periods.

strengthen the grain boundary and grain densification, thereby decreasing the dissolution of CaSiO_3 ceramics. The incorporation of Sr into CaSiO_3 decreases the pH value in SBF. The pH value has multiple effects on HBDC metabolism and function [31]. The most important and interesting is that when bone forms, the crosslinking of the collagen chains and the subsequent precipitation of hydroxyapatite are pH dependent and require an optimally pH at the bone formation site [32]. Our results showed that the incorporation of Sr in CaSiO_3 decreased the pH value in SBF, suggesting a potential preferable material for *in vitro* bone cell culture.

Our results showed that the release of Sr ions in SBF and cell culture medium can be tailored by varying the Sr concentration in CaSiO_3 . The release of Sr ions into the SBF and cell culture medium was low, where the maximum ratio of Sr/Ca in SBF was no more than $1.3 \text{ mol}\%$, and the maximum ratio of Sr/Ca in cell culture medium was no

