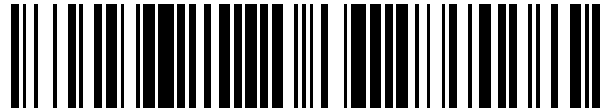


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 635**

21 Número de solicitud: 201001192

51 Int. Cl.:

A61F 2/02 (2006.01)

A61L 27/30 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

A61F 2/30 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **16.09.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **22.02.2011**

Fecha de la concesión: **19.12.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **29.12.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
29.12.2011

73 Titular/es:
BIOTECHNOLOGY INSTITUTE, I MAS D, S.L.
SAN ANTONIO 15, 5
01005 VITORIA, ARABA/ÁLAVA, ES

72 Inventor/es:
TEJERO CANTERO, RICARDO y
ANITUA ALDECOA, EDUARDO

74 Agente: **Trigo Peces, José Ramón**

54 Título: **IMPLANTE CON CALCIO EN SU SUPERFICIE, Y MÉTODO DE MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE UN IMPLANTE PARA DOTAR A DICHA SUPERFICIE DE CALCIO.**

57 Resumen:

La invención se refiere a un implante para cuerpo humano o animal, que en su superficie externa comprende al menos una sal de calcio soluble en líquido polar, y a diversos métodos para la preparación del implante anterior. Los iones de calcio contenidos en la superficie del implante dotan a dicha superficie de cuatro propiedades química o biológicamente muy deseables: hidrofiliidad, protección frente a la contaminación atmosférica, propiedad procoagulante y propiedad promineralizante.

ES 2 352 635 B1

DESCRIPCIÓN

Implante con calcio en su superficie, y métodos de modificación de la superficie de un implante para dotar a dicha superficie de calcio.

5

Sector de la técnica

La invención se refiere a un implante con calcio en su superficie, y a un método de modificación de la superficie de un implante para dotar a dicha superficie de calcio, pretendiendo así conseguir nuevos efectos químicos y biológicos interesantes para conseguir, entre otros beneficios, mejorar la osteointegración del implante en el tejido circundante.

10

Estado de la técnica

El proceso que conduce a la osteointegración satisfactoria de un implante en el tejido adyacente es complejo y comienza con el desencadenamiento de la cascada de coagulación, agregación plaquetaria y formación del coágulo de la sangre circundante al implante, lo que se deriva en el establecimiento de una matriz o red provisional de fibrina alrededor del implante. Esta red provisional cumple dos funciones importantes: permite la estabilidad inicial del implante y la liberación gradual de factores plaquetarios y señalizadores celulares. Los señalizadores celulares estimulan, entre otros procesos y por este orden, la migración celular a la zona de la herida, su adhesión, diferenciación y proliferación y la secreción de la matriz extracelular con su consiguiente mineralización para acabar formando la matriz ósea definitiva alrededor del implante.

15

20

En la capacidad de osteointegración de un implante en el tejido adyacente influyen, en lo que respecta a la superficie del implante, especialmente tres factores: por un lado, son relevantes los materiales utilizados para fabricar el implante; por otro lado, influye el grado de rugosidad de la superficie del implante; en tercer lugar, la superficie del implante puede recibir tratamientos para disponer de un recubrimiento adicional biológicamente conveniente.

25

En lo que respecta a los materiales usados para implantología, estos se consideran biocompatibles en la medida en que su química superficial permite la interacción con las moléculas biológicas claves en el desarrollo del proceso arriba citado y en el tejido biológico en cuestión. Típicamente, estos materiales consisten en titanio o aleaciones en base a titanio, zirconio o aleaciones en base a zirconio; opcionalmente, los materiales pueden contener aditivos en forma de metales biocompatibles como el niobio o el tántalo.

30

En lo que respecta a la rugosidad de la superficie del implante, se ha podido comprobar que la aportación de micro y nanorugosidad en la superficie de estos materiales incrementa notablemente la conexión implante-hueso con respecto a las superficies no rugosas. Se conocen numerosos métodos para obtener rugosidad, como por ejemplo el granallado o el tratamiento ácido (o combinaciones de ambos).

35

Por último, en lo que respecta al tratamiento de la superficie de los implantes, en el estado de la técnica se conocen múltiples métodos de fabricación o tratamiento de implantes en los cuales el implante es provisto de un recubrimiento que persigue mejorar algunas de las propiedades del implante, mejorar y acelerar la osteointegración del mismo y/o reducir el riesgo de rechazo del mismo por parte del paciente.

40

Entre ellos, se conocen métodos que permiten la aplicación sobre la superficie del implante de fosfatos cálcicos (Ca/P) (particularmente, de entre ellos, la hidroxiapatita) con el fin de dotar al implante de un recubrimiento cerámico similar a la parte mineral del hueso. El fin de dicho recubrimiento cerámico es aumentar las propiedades osteoconductoras del implante para fomentar la regeneración ósea periimplante. Dentro de estos métodos de aplicación de fosfatos cálcicos se conocen, por un lado, métodos en los cuales los fosfatos cálcicos son aplicados al implante por vías húmedas o SBF ("Simulated Body Fluid", ver Kim, H. M.; Miyaji, F.; Kokubo, T. & Nakamura, T. (1996), "Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment", J Biomed Mater Res 32(3), 409-417). En estos métodos el implante se sumerge en una solución que contiene una serie de iones, entre ellos iones Ca y P, dando lugar a la precipitación de fosfatos cálcicos en la superficie del implante. Ejemplos de estos métodos por vías húmedas o SBF pueden encontrarse en EP0389713, EP1384524 y US6426114. Se conocen por otro lado métodos en los que los fosfatos cálcicos son aplicados al implante por vías electroquímicas. En estos métodos, el implante es sumergido en una solución que contiene una serie de iones, entre ellos iones Ca y P, formándose capas de fosfato cálcico sobre el implante de manera mas acelerada gracias a la aplicación de procesos electroquímicos (ver Yang, B.; Uchida, M.; Kim, H.-M.; Zhang, X. & Kokubo, T. (2004), "Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment", Biomaterials 25(6), 1003-1010; ver Rössler, S.; Sewing, A.; Stölzel, M.; Born, R.; Scharnweber, D.; Dard, M. & Worch, H. (2003), "Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH and temperature", J Biomed Mater Res A 64(4), 655-663). Ejemplos de estos métodos por vías electroquímicas pueden encontrarse en EP1264606, US5478237, y WO2004024200. Se conocen también métodos en los que los fosfatos cálcicos son aplicados al implante por vías físicas. En dichos métodos se pulverizan precursores de Ca/P sobre el implante mediante plasma spray o láser (ver Arias, J. L.; García-Sanz, F. J.; Mayor, M. B.; Chiussi, S.; Pou, J.; León, B. & Pérez-Amor, M. (1998), "Physicochemical properties of calcium phosphate coatings produced by pulsed laser deposition at different water vapour pressures", Biomaterials 19(10), 883-888). Ejemplos de estos métodos pueden encontrarse en EP0202908, EP0864332 y WO9821380. En todos los citados métodos, el acabado superficial final del implante es seco.

45

50

55

60

65

Además de los anteriores, existen otros métodos llamados “de acondicionamiento” de la superficie de implantes, en los cuales se varían las propiedades superficiales del implante mediante su almacenamiento en soluciones diluidas de cloruro sódico (NaCl) (ver por ejemplo el documento US20040210309A1) o su inmersión previo uso en soluciones diluidas de hidróxido sódico (NaOH) (ver por ejemplo Stadlinger, B.; Lode, A. T.; Eckelt, U.; Range, U.; Schlottig, F.; Hefti, T. & Mai, R. (2009), “Surface-conditioned dental implants: an animal study on bone formation”, J Clin Periodontol 36(10), 882-891). En el primer caso se persigue mantener el implante en un medio que evite su contaminación atmosférica por hidrocarburos y que preserve el nivel de limpieza original. Además, el almacenamiento en un líquido iónico permite vencer la hidrofobicidad inducida por la rugosidad de la superficie del implante, lo que favorece la humectabilidad de dicha superficie por líquidos polares. En el segundo caso se pretende la exposición de grupos hidroxilo superficiales, los cuales participan en la formación de fosfatos cálcicos (Ca/P) en la superficie del implante una vez colocado en el alveolo. Este último acondicionamiento presenta una mejor humectabilidad con respecto al no modificado, pero no evita la contaminación superficial previa ya que la inmersión en el líquido se realiza en el mismo momento de su uso.

Existen otros tratamientos de la superficie de implantes que se basan en la modificación de la red cristalina del titanio por la introducción de calcio, dando lugar a titanatos de calcio. Esto se realiza mediante la aplicación de métodos electroquímicos o térmicos durante un tiempo determinado. Un ejemplo de este tipo de tratamiento puede encontrarse en JP2006102212. En superficies de titanio dotadas de estos tratamientos se preconiza una más rápida formación de apatita.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar un método de fabricación de un implante alternativo a los anteriores, en el cual se dote al implante de una superficie diferente, que no sólo presente una alta hidrofiliidad superficial relativamente constante en el tiempo sino que aporte nuevas propiedades biológicas interesantes para la óptima osteointegración e implantación del implante en el hueso y el cuerpo del paciente.

Descripción breve de la invención

Es objeto de la invención un implante para cuerpo humano o animal que presenta la particularidad de que su superficie externa comprende al menos una sal de calcio soluble en líquido polar, es decir, calcio formando parte de un compuesto con capacidad para solubilizarse de forma sustancialmente inmediata al exponerse a un solvente polar (como por ejemplo agua, etanol, etc.). La disolución del calcio equivale a que el calcio se ioniza, es decir, se libera en forma de ion del compuesto inicial.

De este modo, el implante según la invención es tal que, al entrar en contacto con un líquido polar, pasa a disponer de iones de calcio superficiales, en estado libre (iones de calcio libres). Los iones de calcio son capaces de actuar libremente y proporcionar una serie de efectos ventajosos que se explican más adelante (destacando entre dichos efectos su acción procoagulante) y que han sido comprobados mediante ensayo. En cambio, en los implantes convencionales descritos provistos de fosfatos cálcicos (Ca/P) o de titanatos de calcio (CaTiO_3), el calcio se encuentra presente en forma de compuesto insoluble (entendiendo por insoluble cualquier compuesto con una solubilidad en agua menor de 1 g/L) y por lo tanto bloqueado para ser liberado al medio y poder interactuar libremente. Por ello, en dichos implantes convencionales el calcio no es capaz de proporcionar las funciones biológicas que ofrece el calcio en la presente invención.

La sal de calcio soluble en líquido polar presente en la superficie del implante puede presentar varias formas preferentes. Por un lado, la sal de calcio puede estar presente en estado sólido (es decir, el implante tendría un acabado superficial seco o presentación seca). Por otro lado, la superficie externa del implante puede comprender los iones de dicha sal de calcio disociados, o lo que es lo mismo, disueltos en líquido polar (es decir, el implante tendría un acabado superficial húmedo). En tercer lugar, la superficie externa del implante puede comprender al menos una sal de calcio soluble en líquido polar en estado parcialmente disociado (es decir, el implante puede tener un acabado hidratado, donde parte de las sales se encuentren disociadas en sus iones).

Son objeto asimismo de la invención diversos métodos de modificación de la superficie de un implante, para dotar a la superficie del mismo de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar. Dichos métodos se basan en sumergir de forma temporal o permanente el implante en una solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar. La presentación del implante puede ser seca o húmeda, dependiendo del método.

El calcio libre (una vez disociado de la sal de calcio soluble en líquido polar contenida en la superficie del implante) dota a dicha superficie de cuatro propiedades química o biológicamente muy deseables: hidrofiliidad, protección frente a la contaminación atmosférica, propiedad procoagulante y propiedad promineralizante.

El carácter hidrofílico de la superficie del implante es interesante ya que produce que los líquidos biológicos polares como la sangre o derivados de ésta presenten una afinidad completa por la superficie. Por ello, la interacción se produce instantáneamente con todos los puntos de la superficie por igual, maximizando la respuesta biológica por unidad de superficie y la capacidad de formación ósea alrededor de toda la superficie del implante. Este efecto es especialmente interesante en el caso de superficies rugosas, ya que supone el vencimiento de la hidrofobicidad causada por la rugosidad y permite el contacto de toda la superficie por igual con el medio biológico.

La protección frente a la contaminación atmosférica es la capacidad de la superficie del implante de mantenerse limpia de los agentes de contaminación atmosféricos externos. Dicha protección proviene de que la mayor afinidad de los óxidos de titanio superficiales por el calcio y la higroscopicidad de las sales solubles en agua formadas por este último generan una capa hidratada que impide que los hidrocarburos atmosféricos penetren hasta la superficie del óxido y sean adsorbidos por dicha superficie. Esto significa que el presente método según la invención permite preservar libre de contaminación la superficie del implante y, por tanto, permite mantener la hidrofili-
 5 cidad en el tiempo. Además, permite preservar la limpieza inicial del implante, la cual puede haber sido efectuada previamente por algún proceso conocido (limpieza mediante solventes, limpieza por plasma, limpieza por radiación ultravioleta).

El carácter procoagulante supone que la superficie del implante, provista de calcio en un determinado rango de concentraciones superficiales, produce la activación de la cascada de coagulación al entrar en contacto con la sangre o derivados de ésta con contenido en plaquetas. Es conocido que los iones de calcio libres actúan desencadenando numerosos procesos dentro de la cascada de coagulación que llevan a la formación y estabilización del coágulo. Esta forma de calcio superficial implica que la superficie del implante se asimila a un repositorio de iones de calcio.
 10

Por último, el carácter promineralizante de la superficie del implante viene dado por que el calcio remanente o unido a los hidroxilos en la superficie del implante (ver Ellingsen, J. E. (1991), "A study on the mechanism of protein adsorption to TiO_2 ", Biomaterials 12(6), 593-596) puede actuar como punto de nucleación heterogénea de la fase cristalina al incrementar localmente la supersaturación de uno de los elementos clave para la formación de apatita: el calcio.
 15

Como consecuencia de las ventajas enumeradas, el implante objeto de la invención presenta la ventaja global de proporcionar una más rápida y mejor osteointegración. El aumento de la velocidad de osteointegración y/o del porcentaje de aposición ósea alrededor de los implantes objeto de la invención incrementa las posibilidades de implantación, reduce los riesgos de inflamación y los tiempos para realizar la carga funcional.
 20

25 Descripción breve de las figuras

Los detalles de la invención se aprecian en las figuras que se acompañan, no pretendiendo éstas ser limitativas del alcance de la invención:
 30

- La Figura 1 muestra la masa de calcio (μg) por unidad de superficie (mm^2) tras inmersión rápida (5 s) en solución de $CaCl_2$ en etanol a distintas concentraciones y tras secado 1 h a $65^\circ C$ y vacío, para superficies lisas y rugosas.

- La Figura 2 muestra una micrografía de microscopía electrónica de barrido sobre una superficie rugosa sin recubrir con calcio.
 35

- La Figura 3 muestra una micrografía de microscopía electrónica de barrido sobre una superficie rugosa con un recubrimiento de calcio de $2,4 \mu g/mm^2$.

- La Figura 4 muestra una micrografía de microscopía electrónica de barrido sobre una superficie rugosa con un recubrimiento de calcio de $2,4 \mu g/mm^2$ después de haber sido sometida a inmersión en líquido polar.
 40

- La Figura 5 muestra el espectro de dispersión obtenido a partir de una superficie rugosa sin recubrir con calcio.

- La Figura 6 muestra el espectro de dispersión obtenido a partir de una superficie rugosa con un recubrimiento de calcio de $2,4 \mu g/mm^2$.
 45

- La Figura 7 muestra el espectro de dispersión obtenido a partir de una superficie rugosa con un recubrimiento de calcio de $2,4 \mu g/mm^2$ después de haber sido sometida a inmersión en líquido polar.
 50

- La Figura 8 muestra la variación del ángulo de contacto en grados en función de cantidad de Ca^{2+} superficial y del tiempo de exposición.

- La Figura 9 muestra la variación del ángulo de contacto en grados en función de cantidad de Ca^{2+} superficial y del método de lavado.
 55

- La Figura 10 muestra el grado de coagulación final en volumen normalizado con respecto al control positivo en función de la cantidad de calcio disponible; entre paréntesis figura la concentración final de calcio en el plasma.

- La Figura 11 muestra el grado de coagulación final normalizado al valor del control positivo en función de los distintos tratamientos superficiales; entre paréntesis figura la concentración teórica de calcio en el plasma si todo el calcio que hay en la superficie difunde en el plasma para provocar la coagulación.
 60

- La Figura 12 muestra el grado de coagulación final normalizado al valor del control positivo en función de la cantidad de calcio superficial.
 65

- La Figura 13 muestra el espectro de infrarrojos de una muestra tratada con calcio ($2,4 \mu g/mm^2$) y de una muestra sin calcio superficial, sometidas a deposición electroquímicamente asistida de fases de fosfatos de calcio.

- La Figura 14 muestra la viabilidad celular relativa al control positivo tras 24 h de exposición a superficies sin calcio (TiO_2) y con calcio ($1,79$ y $3,26 \mu\text{g}/\text{mm}^2$).

Descripción detallada de la invención

5 Es objeto de la invención un implante cuya superficie comprende al menos una sal de calcio soluble en líquido polar. Al formar parte de una sal soluble, los iones de calcio quedan disociados de forma sustancialmente inmediata al exponerse a un solvente polar. Entonces, cuando el implante según la invención es puesto en presencia de sangre o plasma, los iones de calcio quedan libres (iones de calcio libres) y son capaces, entre otros efectos, de provocar la
10 coagulación alrededor del implante y de acelerar y mejorar su osteointegración. Más concretamente, estos iones de calcio libres aportan a la superficie del implante al menos las siguientes propiedades biológica y químicamente ventajosas, explicadas con anterioridad: propiedad hidrofílica, protección frente a la contaminación atmosférica, propiedad procoagulante y propiedad promineralizante.

15 El implante según la invención puede presentar diversos usos: puede ser colocado en una cadera o en una rodilla para permitir la fijación de una prótesis de cadera o rodilla, puede ser colocado en el hueso maxilar para permitir la fijación de una prótesis dental, etc.

20 El implante según la invención está preferentemente fabricado con titanio comercialmente puro, titanio aleado, circonia o mezclas de aleaciones de titanio y circonia. Opcionalmente, el implante puede contener además aditivos metálicos biocompatibles, como niobio o tántalo. La superficie del implante puede estar provista de macrorrugosidad, preferiblemente proporcionada por los propios hilos de rosca del implante (los implantes generalmente comprenden un cuerpo roscado) u obtenida con depresiones macroscópicas en la superficie del implante. Además, la superficie del implante puede estar provista, si se considera apropiado, de micro y nanorrugosidad adicional superpuesta a la
25 macrorrugosidad. Generalmente la microrrugosidad superficial está en el rango 1 a $75 \mu\text{m}$ (altura de pico a valle) y preferiblemente en el rango 5 a $40 \mu\text{m}$; la nanorrugosidad, superpuesta a la microrrugosidad, se encuentra en el rango $0,1$ a $1 \mu\text{m}$ y preferiblemente en el rango $0,5 \mu\text{m}$ a $0,9 \mu\text{m}$.

30 Por otra parte, la invención comprende tres métodos de fabricación o modificación de la superficie del implante, para dotar a dicha superficie de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar. En todos ellos, el implante es sumergido, bien de forma temporal o bien de forma permanente, en una solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar. Dependiendo del método, el implante puede presentar un acondicionamiento superficial final húmedo o seco.

35 El primer método de modificación de la superficie de un implante de acuerdo con la invención comprende los pasos de sumergir el implante en una solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar, extraer el implante, de manera que sobre su superficie queda depositada una sal de calcio soluble en líquido polar, y almacenar el implante en un envase en cuyo interior existe un ambiente seco (entendiéndose por ambiente seco una atmósfera carente de partículas de agua en suspensión). El implante queda en contacto con dicho ambiente seco, de manera que la sal de calcio soluble en líquido polar permanece en la superficie del implante en estado sólido. El acabado superficial final del implante es por lo tanto seco, dado que la superficie del implante comprende sal de calcio en estado sólido. El implante permanece seco hasta que es extraído del envase, momento en el cual tiende a hidratarse con las partículas de agua en suspensión, en función de la humedad relativa del entorno. Dado que el implante generalmente no es extraído hasta instantes previos a la colocación en el paciente, y que por lo tanto dicha extracción se realiza en quirófano, la
40 hidratación del implante se produce en unas condiciones de extrema limpieza ambiental. Por ello, la presentación en seco garantiza una mínima contaminación del implante (por partículas que estén en suspensión en el aire) previa a su colocación en el paciente.

45 El ambiente seco del interior del envase puede conseguirse por ejemplo sometiendo el interior del envase al vacío una vez introducido el implante. La aplicación de vacío implica la ausencia total de moléculas de agua que puedan hidratar el recubrimiento por coordinación con el compuesto cálcico. Mediante este método, se preserva la superficie en su estado de limpieza inicial de envasado. En otro modo de realización, el ambiente seco se consigue introduciendo en el envase un agente desecante de mayor poder higroscópico que el calcio de la superficie del implante. En este caso, sin necesidad de someter el envase al vacío se preserva el estado seco del implante ya que es el agente desecante el que
50 absorbe las moléculas de agua ambientales. Este agente desecante puede ser gel de sílice, cloruro de calcio o acetato de calcio.

55 El segundo método de modificación de la superficie de un implante de acuerdo con la invención comprende los pasos de sumergir el implante en una solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar, extraer el implante, de manera que sobre su superficie queda depositada una sal de calcio soluble en líquido polar, y almacenar el implante en un envase en cuyo interior existe una atmósfera ambiente, quedando el implante en contacto con dicha atmósfera ambiente. En consecuencia, la sal de calcio permanece en estado sólido, a menos que se trate de una sal deliquescente como el CaCl_2 , en cuyo caso el acabado superficial final del implante es húmedo, es decir, el implante se encuentra hidratado, por la propia autohidratación o deliquesencia del depósito cálcico superficial. En este caso, la autohidratación del implante ocurre durante el envasado y, por lo tanto, también en condiciones de máxima limpieza. Como consecuencia de la autohidratación se forma una película de calcio hidratado que protege la superficie de
60 posibles contaminaciones atmosféricas subsiguientes.

Ambos métodos descritos pueden comprender el paso adicional de secar el implante una vez extraído de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar y antes de ser almacenado, se ejecuta el paso adicional de secar el implante. Preferentemente, el secado se realiza mediante uno o varios de los siguientes métodos: aplicación de calor, aplicación de desecado y aplicación de vacío. La aplicación de calor puede realizarse por ejemplo mediante el mantenimiento en estufa durante un tiempo de entre 1 minuto y 3 horas a una temperatura de entre 50 y 150°C (el tiempo y la temperatura dependen del poder higroscópico de la solución utilizada y de si se aplica vacío, lo cual supone reducir considerablemente los tiempos y temperaturas de la estufa). La aplicación de un desecado puede realizarse por ejemplo manteniendo el implante en un desecador o en un contenedor con agentes desecantes de mayor poder higroscópico que el recubrimiento superficial del implante durante un tiempo mínimo generalmente de 10 minutos. En cualquiera de los casos, la exposición a la atmósfera normal posterior al secado ha de limitarse para evitar la rehidratación superficial.

El tercer método de modificación de la superficie de un implante de acuerdo con la invención comprende el paso fundamental de almacenar el implante (de forma permanente hasta que éste vaya a ser utilizado) en un envase hermético que contiene una solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar, donde la concentración de la solución está entre 20 y 2000 mM. El implante se almacena en contacto con dicha solución y aislado del exterior. En este caso, evidentemente el implante presenta un acabado superficial final húmedo, estando la sal disociada en sus iones y por lo tanto el calcio en forma libre. Al encontrarse siempre sumergido desde el envasado, el implante queda protegido de contaminación externa.

En cuanto al tipo de solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar utilizada, en el primer y segundo método de acuerdo con la invención se utiliza preferentemente una disolución de cloruro de calcio en cualquiera de sus estados de hidratación en agua desmineralizada o en etanol o, alternativamente, una disolución de acetato de calcio en cualquiera de sus estados de hidratación en agua desmineralizada. La preferencia por estas sales de calcio se debe a la alta solubilidad de ambas en agua: mayor de 60 g/100 mL a temperatura ambiente en el caso del cloruro de calcio y mayor de 30 g/100 mL en el caso del acetato de calcio, lo que supone que en las concentraciones de interés, estas sales están completamente disociadas en sus iones. La disolución de cloruro de calcio en etanol es interesante porque permite una mayor mojabilidad de la superficie a tratar ya que el etanol posee una menor tensión superficial que el agua. En este método, el implante en su estado final previo a la aplicación comprende cloruro de calcio o acetato de calcio hidratado (con moléculas de agua), independientemente del tipo de solvente utilizado (agua desmineralizada o etanol). Así, en caso de que el solvente sea etanol, éste se evapora y, en condiciones normales, es reemplazado con agua atmosférica hasta llegar al límite de hidratación del depósito cálcico remanente en la superficie. Este límite de hidratación viene dado por la humedad relativa del ambiente. El mayor o menor nivel de hidratación no afecta la cantidad efectiva de calcio en la superficie del implante, que viene determinada por la retención del mismo durante el proceso de inmersión en la solución cálcica y que aumenta con la concentración en calcio de la solución de partida y la superficie disponible (ver Ensayo 1). El tiempo de inmersión debe ser de al menos 5 segundos para que toda la superficie del implante quede cubierta de calcio homogéneamente.

En el tercer método de la invención se utiliza preferentemente una disolución de cloruro de calcio en cualquiera de sus estados de hidratación en agua desmineralizada o, alternativamente, una disolución de acetato de calcio en cualquiera de sus estados de hidratación en agua desmineralizada. La disolución de cloruro de calcio en etanol, utilizable en los métodos primero y segundo, no se utiliza en este tercer método. El motivo es que, siendo un almacenamiento en solución, la mojabilidad de toda la superficie del implante está garantizada y, en caso de usar etanol, el proceso en clínica se ve retrasado a la espera de la evaporación del etanol (una vez extraído el implante del envase) y la posterior rehidratación del calcio ionizado con las partículas de agua atmosféricas. Realizar la implantación con la superficie todavía conteniendo etanol no interesa ya que el etanol tiene un efecto anticoagulante en la sangre.

Para el primer y segundo método, la concentración de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar está preferentemente comprendida entre 20 y 2000 mM, mientras que para el tercer método la concentración de la solución se encuentra necesariamente dentro de este rango. Este rango permite que el implante presente las propiedades citadas de hidrofiliidad, protección frente a la contaminación atmosférica y propiedad promineralizante, como se demuestra mediante los experimentos que se detallan más adelante. Para que el implante presente además propiedades procoagulantes, la concentración de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar debe estar entre 100 y 1000 mM, como se ha demostrado también mediante ensayos.

Además de contar con una superficie hidrofílica, protegida frente a la contaminación atmosférica, con propiedad procoagulante y propiedad promineralizante, el implante de acuerdo con la invención presenta una ventaja adicional que se explica en detalle a continuación.

Como es sabido, la superficie de un implante dental de titanio es una superficie polar ya que comprende iones O^- y OH^- junto con los óxidos de titanio superficiales. Cuando el implante se coloca en el paciente, la superficie polar del implante entra en contacto con el torrente sanguíneo. Como es conocido, multitud de biomoléculas hidrosolubles presentes en el paciente, que participan en los procesos osteogeneradores y que poseen cargas eléctricas, son potencialmente atraídas por la superficie polar del implante. En particular, es conocido que iones de calcio libres Ca^{2+} presentes en el torrente sanguíneo (alrededor de 0,4 mg/mL; ver Ellingsen JE, 1991 Biomaterials) llegan a formar uniones electrostáticas con las cargas negativas de la superficie del implante y que dichas uniones electrostáticas presentan importantes ventajas en el medio y largo plazo post-implantación, favoreciendo la osteointegración del implante. Así, los iones de calcio Ca^{2+} de las uniones electrostáticas $OH^- - Ca^{2+}$ inducen la adsorción de $H_xPO_4^{3-x}$ del medio biológico.

co, fomentando la formación de fases de fosfato de calcio, que son las precursoras óseas. Además, el calcio es capaz de atraer muchas proteínas con residuos ácidos (cargadas negativamente) que participan en el proceso de regeneración ósea mediante mecanismos específicos de unión de calcio. En definitiva, el éxito del titanio como biomaterial se debe a que su unión con el calcio presente en la sangre es el pilar fundamental del mecanismo de adsorción de proteínas a su superficie (a sus óxidos) y de los procesos subsiguientes que dan lugar a la osteointegración.

Por lo tanto, el hecho de someter una superficie de óxido de titanio previamente a soluciones con iones de calcio implica que una parte de este calcio queda unido de forma electrostática a las cargas parcialmente negativas de la superficie antes de entrar en contacto con el paciente. Así se aprovecha todo el potencial de la superficie para adsorber iones de Ca^{2+} (mayor rendimiento de adsorción por unidad de superficie) ya que ésta no ha sido objeto de contaminación atmosférica.

En conjunto, la superficie del implante objeto de la presente invención permite una más rápida y mejor osteointegración, debido a dos motivos: en primer lugar, por la disponibilidad inmediata de iones de calcio superficiales; en segundo lugar, por el mayor número de iones de calcio superficiales capaces de actuar como puntos de nucleación de la fase cristalina, gracias al aprovechamiento de prácticamente todos los grupos OH de la superficie del implante. De este modo, se consigue que los procesos desencadenados por el calcio ocurran desde el primer momento post-implantación y permitan una regeneración ósea peri-implante más rápida y de mejor calidad.

El método de acuerdo con la invención presenta también diferencias y efectos distintos con respecto a métodos convencionales en los que se almacena el implante en soluciones diluidas de cloruro sódico (NaCl) o hidróxido sódico (NaOH). Tanto en dichos métodos convencionales como en el método de la presente invención se consigue eliminar la hidrofobicidad del implante debida a su rugosidad (liberando el aire retenido en la rugosidad) y preservar el implante del contacto con especies de hidrocarburos atmosféricos (excepto en el caso referido en Stadlinger B, 2009 J Clin Periodontol porque, en ese caso, el implante se sumerge justo antes de su uso, en vez de estar preservado o almacenado en solución, o con una capa protectora, como en la presente invención), consiguiendo mayor limpieza superficial. Sin embargo, en dichos métodos convencionales se almacena el implante en NaCl o NaOH sin ninguna actividad biológica dentro de la cascada de coagulación (como se podrá entender posteriormente a partir de la explicación detallada de la Figura 5), mientras que en el implante según la invención se consiguen los dos efectos ventajosos descritos: por un lado, la unión previa de iones de calcio a los grupos hidroxilo de la superficie del implante, la cual favorece la biomineralización y la formación de la matriz definitiva alrededor del implante, es decir, la osteointegración; por otro lado, el exceso de calcio no unido a los hidroxilos superficiales del implante queda libre para proporcionar ventajas propias (desencadenar el proceso de coagulación y la formación de la matriz provisional en los momentos iniciales post-insersión, etc.). Las cualidades del implante según la invención, además, están presentes desde los primeros instantes y en los puntos de mayor relevancia clínica, es decir, en la interfase hueso-implante.

Por otro lado, con respecto al método descrito en la patente WO0224243A1 (en la cual se describe el tratamiento superficial de un implante mediante su baño sucesivo en diferentes ácidos, seguido de una neutralización, lavado y aplicación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento, PRGF) se consigue una mejora de la aplicabilidad en clínica ya que no es necesario activar el PRGF con cloruro de calcio sino que éste se activa simplemente al entrar en contacto con la superficie del implante, dado que ésta está provista de sales de calcio solubles en el PRGF.

Resultados experimentales

A continuación se detallan una serie de experimentos cuyos resultados han demostrado que la superficie del implante de acuerdo con la invención efectivamente posee las propiedades hidrofílica, de protección frente a la contaminación atmosférica, procoagulante y promineralizante, mencionadas a lo largo del presente documento. Además, en un subsiguiente experimento se ha estudiado la mineralizabilidad de la superficie y se ha comprobado la capacidad de los recubrimientos de calcio para formar apatita en comparación con las superficies no recubiertas (es decir, se ha comprobado el carácter promineralizante de la superficie). Por último, se ha realizado un estudio de citotoxicidad que ha permitido descartar cualquier efecto negativo de estos recubrimientos sobre células osteoblásticas (es decir, se ha comprobado que el recubrimiento según la invención permite que sobre el implante tenga lugar una correcta adhesión de células osteoblásticas).

Dichos experimentos son los siguientes:

- Ensayo 1: Bases para el cálculo de la cantidad de calcio superficial.
- Ensayo 2: Caracterización topográfica y análisis composicional.
- Ensayo 3: Hidrofilicidad y protección frente a la contaminación.
- Ensayo 4: Carácter procoagulante.
- Ensayo 5: Carácter promineralizante.
- Ensayo 6: Citotoxicidad.

Ensayo 1

*Bases para el cálculo de la cantidad de calcio superficial*5 1. *Objetivo*

El objetivo del primer ensayo fue determinar la cantidad de calcio arrastrada por unidad de superficie en función de los siguientes parámetros: el hecho de que la solución de CaCl_2 utilice como disolvente agua desmineralizada o etanol; la concentración de CaCl_2 de dicha solución.

10

2. *Materiales y métodos*

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Scharlab S.L., Barcelona, España.

15 Por un lado se prepararon las superficies de los implantes. Para ello se utilizaron implantes con una rugosidad $S_a = 0,7 \mu\text{m}$ y $S_{dr} = 35\%$. Dichos implantes fueron lavados con tritón X-100, acetona y etanol durante 20 min cada uno en ultrasonidos. Se utilizaron 5 implantes por cada una de las concentraciones de soluciones de partida.

20 Por otro lado se prepararon las soluciones. Como soluto se utilizó cloruro cálcico dihidrato $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CaCl_2). Como solvente se utilizó por una parte etanol 95 wt.% y por otra agua desmineralizada. El rango de concentraciones de la solución que se utilizó fue de 28 a 912 mM.

25 Entonces se procedió a una inmersión rápida y a realizar las valoraciones. Así, los implantes se sometieron a una inmersión rápida (5 s) en viales que contenían 1 mL de las diferentes soluciones de cloruro cálcico; posteriormente se extrajeron los implantes y se colocaron en viales con 1 mL de agua. Tras 5 h, se depositó el contenido de cada vial (implante + agua) en un erlenmeyer; se añadió 4 veces 1 mL de agua al vial y a continuación al erlenmeyer para arrastrar todo el contenido del vial. El implante permaneció sumergido durante la valoración. Como agente valorante se utilizó EDTA 0,05M, con unas condiciones de pH 11 ajustado con NaOH 2M. Como indicador se utilizó murexida.

30 Posteriormente se aplicó un secado de los implantes, sometiéndolos a 65°C en estufa al vacío durante 1 h tras la inmersión rápida en las soluciones.

3. *Resultados y discusión*35 3.1 *Elección del solvente*

TABLA 1

40 *Dispersión de los resultados de cantidad de calcio arrastrada por unidad de superficie en % en función del solvente utilizado*

Solvente	Agua	Etanol	Etanol y secado
Media de coeficiente de variación (%)	16,91	13,30	13,15

45

Los ensayos previos de cantidad de calcio arrastrada por las superficies en función del tipo de solvente utilizado permitieron determinar que en el caso de disolver el calcio en etanol se generan recubrimientos con menor dispersión en el valor de calcio superficial que en el caso de calcio disuelto en agua (Tabla 1). Esto se debe a que, siendo el etanol un líquido con menor tensión superficial que el agua, la humectación de toda la superficie rugosa en inmersión rápida es más homogénea. En el caso de CaCl_2 en etanol pero sin secado, puede ocurrir que la evaporación del etanol no haya sido completa, dando lugar a una rehidratación con agua parcial. Por lo tanto, para una mayor reproducibilidad se elige el método de inmersión rápida en CaCl_2 en etanol y secado posterior.

55

3.2 *Cantidad de calcio arrastrada por unidad de superficie*

En la Figura 1 se muestra la relación entre la cantidad de calcio superficial y la concentración de inicial en calcio de las soluciones con las que se tratan los implantes (concretamente, se muestra la masa de calcio (μg) por unidad de superficie (mm^2) tras inmersión rápida (5 s) en solución de CaCl_2 en etanol a distintas concentraciones y tras secado 1 h a 65°C y vacío, para superficies rugosas). El uso de etanol como solvente supone que las desviaciones sobre cada valor son mínimas.

60

El coeficiente de arrastre que se deduce al hacer una regresión lineal de los datos obtenidos $3,4 \pm 3 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{mM}^{-1}$.

65

Los resultados de los siguientes ensayos se expresarán en función de la cantidad de calcio superficial calculada con este coeficiente y no de las concentraciones iniciales de solución de CaCl_2 .

Ensayo 2

*Caracterización topográfica y análisis composicional*5 1. *Objetivo*

El objetivo de este ensayo es evaluar la morfología de la superficie recubierta con calcio y determinar su composición elemental antes y después de ser sometida a la inmersión en un líquido polar.

10 2. *Materiales y métodos*

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Scharlab S.L., Barcelona, España.

15 Por un lado se prepararon las superficies de los implantes. Para ello se utilizaron discos de 6 mm de diámetro por 3 mm de alto con una rugosidad $S_a = 0,7 \mu\text{m}$ y $S_{dr} = 35\%$. Dichos discos fueron lavados con tritón X-100, acetona y etanol, 20 min cada uno en ultrasonidos.

20 Por otro lado se prepararon las soluciones. Como soluto se utilizó $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dihidrato). Como solvente se utilizó etanol 95 wt.%.

Para realizar los recubrimientos, se depositó el volumen equivalente al arrastrado por implantes de superficie semejante para dar una concentración finales de $2,4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$.

25 Posteriormente se efectuó un secado de los discos, sometiéndolos a 65°C en estufa al vacío durante 1 h tras el recubrimiento con las soluciones. Los discos sometidos a lavado fueron además sumergidos 3 veces en agua desmineralizada y se dejaron secar al aire.

30 Para el análisis de las muestras se usó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5500LV (Akishima City, Tokyo, Japón) y un espectrómetro de energías dispersadas (EDS) Oxford Inca 300 (Witney, Oxon, UK) que permite la detección de los elementos situados por encima del carbono (incluido) en la tabla periódica de los elementos. Las imágenes fueron tomadas a una tensión de aceleración de 20 kV.

3. *Resultados y discusión*35 3.1 *Morfología de los recubrimientos*

A diferencia de los discos sin recubrir (Figura 2), en los discos recubiertos con calcio se aprecia una capa sobre la superficie rugosa subyacente (Figura 3). Al realizar el lavado de la superficie en agua desmineralizada, se puede observar como el recubrimiento de calcio parece haber desaparecido (Figura 4), presumiblemente disuelto en el medio polar en el que ha sido tratado. Este es el efecto deseado en el caso de entrar en contacto con la sangre o el plasma (ver Ensayo 4).

3.2 *Análisis elemental*

45 El análisis composicional de las superficies con calcio revela la presencia de la sal en la superficie (Figura 6). El ratio Ca/Cl corresponde bien con la composición de la sal, encontrándose aproximadamente el doble de Cl que de Ca (CaCl_2). Tras el lavado y tal y como se intuye por microscopía electrónica (Figura 4) se puede comprobar como la mayor parte de la sal ha desaparecido de la superficie (Figura 7), pasando al medio polar en el que ha sido sumergida. Este es el efecto deseado para desencadenar la coagulación sobre la superficie en el caso de que el líquido polar al que estén expuestas sea sangre o plasma (ver Ensayo 4). Sin embargo, una pequeña cantidad todavía es detectable por EDS, resultado que coincide con lo obtenido previamente mediante XPS (X-Ray PhotoSpectroscopy en sus siglas en inglés, ver Ellingsen JE, 1991 Biomaterials) y que corrobora la presencia de una cantidad de calcio en la superficie que puede ser beneficiosa para etapas posteriores de la biomineralización (ver Ensayo 5).

55 Por otro lado, la ausencia de picos de carbono en los espectros de las superficies tratadas con calcio, lavadas o no (Figuras 6 y 7), indica que el tratamiento con calcio tras la limpieza permite evitar la contaminación por adsorción de hidrocarburos atmosféricos que sí ocurre en las muestras que no han sido tratadas con calcio (Figura 5).

60 Este ensayo ha permitido determinar la morfología de los recubrimientos, así como evaluar la composición de los mismos, antes y después de ser sometidos a líquidos polares. Los resultados de este ensayo son muy útiles para analizar a su vez los resultados de los Ensayos 3, 4 y 5.

65

Ensayo 3

*Hidrofilicidad y protección frente a la contaminación*5 1. *Objetivo*

El objetivo del tercer ensayo fue determinar la variación del ángulo de contacto en función de la cantidad de calcio retenida por los implantes y su prevalencia en la superficie en función del tiempo y de distintos lavados.

10 2. *Materiales y métodos*

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Scharlab S.L., Barcelona, España.

15 Por un lado se prepararon las superficies de los implantes. Para ello se utilizaron discos de 12,7 mm de diámetro por 1 mm de alto con una rugosidad $S_a = 0,7 \mu\text{m}$ y $S_{dr} = 35\%$. Dichos discos fueron lavados con tritón X-100, acetona y etanol, 20 min cada uno en ultrasonidos. Se utilizaron 8 discos por cada una de las concentraciones de soluciones de partida.

20 Por otro lado se prepararon las soluciones. Como soluto se utilizó $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dihidrato). Como solvente se utilizó etanol 95 wt.%.

25 Para realizar los recubrimientos, se depositó el volumen equivalente al arrastrado por implantes de superficie semejante para cada una de las concentraciones para dar unas concentraciones finales de 0,2; 0,7; 1,4; 2,4 y 2,9 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$.

30 Seguidamente se separaron tres muestras de discos: a) una primera muestra destinada a no someterse a lavado, para ser utilizada con el fin de determinar la influencia del tiempo de exposición al aire en la contaminación de la superficie y su potencial pérdida de hidrofiliicidad; b) una segunda muestra que fue sometida a lavado suave (inmersión 3 veces en agua desionizada); c) una tercera muestra que fue sometida a lavado fuerte (aplicación de ultrasonidos durante 5 minutos).

35 Posteriormente se efectuó un secado de los discos, sometiéndolos a 65°C en estufa al vacío durante 1 h tras el recubrimiento con las soluciones. Para los ensayos de estabilidad en el tiempo, los discos se dejaron expuestos al aire durante 1 y 3 días.

Para la medida del ángulo de contacto se usó un medidor de tensión óptico KSV Theta T-200 (Attension®, Helsinki, Finlandia). Se tomó la media entre la medida del ángulo de contacto derecho e izquierdo a los 30 s de exposición.

40 3. *Resultados y discusión*3.1 *Influencia del tiempo de tratamiento*

45 La influencia del tiempo de incubación de cada disco en las soluciones de partida a distintas concentraciones en el ángulo de contacto se midió para tiempos de tratamiento de inmersión rápida (5 s), de inmersión durante 3 h y de inmersión durante 50 días. Los resultados (no mostrados) indican que no existen diferencias significativas con respecto al tiempo de incubación en las soluciones de origen, por lo que se adoptó un protocolo común de inmersión rápida de 5 s y secado en estufa como se describe en los métodos.

50 3.2 *Protección frente a la contaminación*

55 Tras la realización de los recubrimientos, las superficies se dejaron expuestas al aire durante distintos períodos de tiempo para evaluar el efecto de la exposición de los recubrimientos a la atmósfera y determinar una potencial pérdida de hidrofiliicidad por la incorporación de especies hidrofóbicas en suspensión en el aire. En la Figura 8 se muestra la variación del ángulo de contacto en grados en función de la cantidad de Ca^{2+} superficial y del tiempo de exposición. Los resultados muestran que el ángulo de contacto apenas varía si las superficies quedan expuestas durante 1 y 3 días a la contaminación ambiental. Es decir, el ensayo demostró que el depósito de calcio superficial consigue evitar la hidrofobización debida a la contaminación por hidrocarburos atmosféricos (ver también el Ensayo 2, sobre la composición elemental de la superficie con y sin calcio).

60 3.3 *Estabilidad del depósito de calcio*

65 Una vez recubiertos y secos, los discos fueron sometidos a dos tipos de limpieza en agua. El objetivo era determinar si tras los lavados permanecía suficiente calcio superficial como para mantener las condiciones hidroflicas del recubrimiento de origen. Para ello se sometió a los discos a un lavado suave, consistente en la inmersión 3 veces en agua desmineralizada y a un lavado fuerte, en el que se sometieron a limpieza por ultrasonidos durante 5 minutos.

La Figura 9 muestra la variación del ángulo de contacto en grados en función de la cantidad de Ca^{2+} superficial y del método de lavado. Como puede observarse:

- 5 - En los discos sin lavar (marcas cuadradas en la figura), a partir de $0,7 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ de calcio por unidad de superficie, el recubrimiento dota a la superficie de un carácter superhidrofílico (ángulo de contacto $< 5^\circ$).
- 10 - En los discos sometidos a un lavado suave (marcas circulares en la figura), simulando condiciones de inmersión del implante en otro líquido polar (agua, plasma, sangre) en las que parte el calcio superficial pueda difundirse al medio y, por tanto, desvincularse de la superficie, se observa que el ángulo de contacto aumenta con respecto a las superficies sin lavado pero se mantiene en condiciones muy hidrofílicas ($< 20^\circ$) comparado con la referencia sin recubrimiento.
- 15 - En los discos sometidos a un lavado fuerte (marcas triangulares en la figura), simulando condiciones extremas, con 5 min de lavado en ultrasonidos, la medida de ángulo de contacto no desciende en ningún momento de los 20° , cosa que sí ocurre incluso para el recubrimiento con menos calcio en el caso del lavado suave. Parece lógico que una limpieza de este tipo logre eliminar un porcentaje del recubrimiento de calcio suficiente como para ver su efecto en un aumento del ángulo de contacto. A partir de $1,4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, sin embargo, este tipo de limpieza no parece afectar al remanente y el ángulo de contacto permanece en el intervalo $20-30^\circ$. En cualquier caso, cabe destacar que incluso una limpieza mediada por ultrasonidos es incapaz de eliminar el carácter más hidrofílico de las superficies con calcio respecto a las que no tienen calcio. Se puede suponer que una cantidad no despreciable de recubrimiento sigue presente en las cavidades de la superficie rugosa.

En el caso de las muestras de referencia, sin calcio, la diferencia entre ángulos de contacto se debe a que la última etapa antes del secado y medida de ángulo de contacto fue agua en el caso de las muestras “lavadas” y etanol en el caso de las muestras “sin lavar”. Este último solvente proporciona un mayor grado de hidroxilación superficial y de ahí el descenso de ángulo de contacto de este tipo de muestras.

Por lo tanto, en lo que se refiere a las propiedades hidrofílicas, el ensayo demostró que los implantes tratados según el método descrito siguen manteniendo su propiedades sustancialmente más hidrofílicas que los no tratados, incluso tras ser sometidos a procesos de limpieza mecánica extremos.

Ensayo 4

35 *Carácter procoagulante*

1. *Objetivo*

El objetivo del cuarto ensayo fue determinar para qué cantidades de calcio por unidad de superficie permiten desencadenar la coagulación del plasma sanguíneo. Para ello, primero se determinó el rango de concentración de calcio en plasma más óptimo para provocar la coagulación en volumen (sin superficie) y después se evaluó qué rangos de concentración superficial de calcio estimulan la coagulación, esta vez en presencia de la superficie. Además, se incluyeron acondicionamientos superficiales basados en sodio (NaOH y NaCl) para confirmar su carácter no procoagulante.

45 *2. Materiales y métodos*

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Scharlab S.L., Barcelona, España.

Por un lado se preparó un plasma. Para ello, se extrajo sangre de tres pacientes sanos. Se aplicó una técnica similar a la descrita en la patente EP1066838B1 para obtener un Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF): se centrifugó la sangre durante 8 min a 460 G, separando la columna de plasma de la de glóbulos rojos y glóbulos blancos por pipeteado manual (a diferencia del protocolo descrito en EP1066838B1, en este caso por criterios de volumen para la realización de los experimentos, se seleccionó toda la columna de plasma y no solamente la parte más rica en plaquetas). Se desecharon tanto los glóbulos rojos como los glóbulos blancos.

Con el fin de determinar los rangos de concentración de calcio en las soluciones capaces de desencadenar la coagulación del plasma y como paso previo a la modificación de las superficies con dichas soluciones, se midió el grado de coagulación en función de la concentración de calcio en volumen como sigue:

60 a) *Coagulación en función de la concentración de calcio en volumen*

Con el fin de determinar los rangos de concentraciones de calcio en plasma que provocan la coagulación, se colocaron $10 \mu\text{l}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{EtOH}$ en concentraciones entre 28 y 2000 mM en el fondo de una placa multipocillo de 96. Se dejó secar el contenido de los pocillos (es decir, que se produjera la evaporación del etanol y una posterior autohidratación) y se rellenaron con $200 \mu\text{l}$ de plasma para dar unas concentraciones finales de 1,3; 2,5; 12,5; 22,8; 45,6 y 100 mM de calcio en plasma. Para el control positivo (Ctrl +) se mezclaron previamente a la colocación en la placa $10 \mu\text{l}$ de 10 wt.% de calcio hexahidrato en $200 \mu\text{l}$ de plasma (22.8 mM de concentración final) y se colocaron posteriormente en los pocillos de control. El control negativo (Ctrl -) se preparó de la misma manera pero sin activar

con 10 μl de 10 wt.% de calcio hexahidrato. Se usaron 8 réplicas por caso. Inmediatamente se procedió a la medida de la absorbancia como se detalla más abajo.

b) *Coagulación en presencia de superficies con o sin calcio*

En primer lugar se prepararon las superficies. Para el estudio de la coagulación mediada por el calcio remanente superficial se usaron tubos huecos (para permitir el paso del haz de lectura longitudinalmente) de 6 mm de diámetro y 1 mm de pared dotados de una rugosidad $S_a = 0,7 \mu\text{m}$ y $S_{dr} = 35\%$, lavados con tritón X-100, acetona y etanol, 20 min cada uno en ultrasonidos. Se utilizaron 8 tubos por concentración.

Se prepararon las soluciones. Por un lado, se prepararon soluciones de calcio, realizadas con soluto $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dihidrato) y solventes Etanol 95 wt.% y agua desmineralizada. Por otro lado se preparó una solución de NaOH 50 mM en agua desmineralizada y una solución de NaCl isotónica 0,9 wt.%.

Entonces, los tubos se sometieron a inmersión rápida (5 s) en pocillos con las soluciones de cloruro cálcico (1 ml) a cada una de las concentraciones de estudio. Acto seguido, se efectuó un secado de los tubos, sometiéndolos a 65°C en estufa al vacío durante 1 h tras la inmersión en las soluciones. Aquéllos tubos tratados con NaOH y NaCl fueron expuestos a dichas soluciones y usados inmediatamente, sin dejar secar, tal y como se usan en sus versiones comerciales.

Los tubos en los pocillos fueron rellenados con 140 μl de plasma cada uno con la ayuda de una multipipeta. Los controles positivos y negativos se prepararon como en el caso de la medida en volumen pero, esta vez con los tubos en los pocillos. Además, la cantidad de 10 wt.% de calcio hexahidrato usada para el control positivo fue acorde al volumen de plasma (140 μl), es decir, 7,4 μl .

Inmediatamente después de rellenar los tubos, se inició la medida de la absorbancia (densidad óptica) con un equipo de espectrofotometría a la longitud de onda de 450 nm. La temperatura de medida fue de 37°C y se tomaron puntos cada minuto de medida durante 100 min. Los resultados se presentan normalizados con respecto al control (grado de coagulación del control = 1).

3. Resultados y discusión

Las curvas de cinética de coagulación completas (no incluidas por su difícil lectura comparativa) muestran cómo existe un período de latencia de unos 5 a 10 min en los que la absorbancia permanece en los valores iniciales (0) y como, a partir de un punto, el valor aumenta progresivamente en función del tiempo a medida que la red de fibrina se va formando y densificando tal y como es característico del proceso de coagulación. Esta reticulación progresiva implica un mayor bloqueo del paso del haz de lector y de ahí el aumento de la absorbancia. En alrededor de 30 min desde el inicio del proceso se llega a una estabilización del valor de absorbancia que indica el fin del mismo. Es en ese punto donde se recogen los valores de absorbancia (densidad óptica) para comparar entre las diferentes muestras.

De este modo, la Figura 10 muestra el grado de coagulación final en volumen (sin superficies) normalizado con respecto al control positivo (Ctrl + = 1), en función de la cantidad de calcio disponible (entre paréntesis figura la concentración final de calcio en el plasma). En el gráfico se puede observar que existe un rango de concentración por encima de 2,5 y por debajo de 45,6 mM de calcio en plasma en el que el grado de coagulación llega en algunos casos incluso a ser superior al del control positivo.

La Figura 11 muestra el grado de coagulación en el interior de los tubos de titanio normalizado al valor del control positivo en función de los distintos tratamientos superficiales (entre paréntesis figura la concentración teórica de calcio en el plasma si la muestra contenía calcio en su superficie y si todo el calcio hubiera difundido en el plasma para provocar la coagulación). El gráfico refleja el grado de coagulación en el interior de los tubos una vez el proceso de coagulación ha terminado, en el caso de que éste haya tenido lugar. A su vez, la Figura 12 muestra el grado de coagulación para el caso exclusivamente de recubrimientos superficiales con calcio a distintas concentraciones superficiales.

En las Figuras 11 y 12 se puede observar el mismo experimento que en la Figura 10 pero esta vez las medidas se tomaron con el calcio incorporado a las superficies. También se añadieron modificaciones superficiales existentes en el mercado basadas en NaOH y en NaCl para saber si éstas eran capaces de promover la coagulación superficial (Figura 11). El control positivo se realizó de la misma manera que en la ocasión anterior: 10 wt.% de calcio hexahidrato mezclado con plasma a 22,8 mM y depositado en el pocillo (con una superficie sin tratar en él).

En el caso de las superficies sin calcio (control negativo, NaOH y NaCl) resulta evidente la ausencia de coagulación. En el caso de las superficies con calcio, el proceso de coagulación es mayor o menor en un determinado rango de concentración de calcio. Así, una concentración de $0,52 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ es insuficiente para provocar la coagulación, mientras que en el intervalo $0,7$ a $3,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ se obtiene en algunos casos incluso más señal que en el caso del control positivo. A partir de $1 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, el grado de coagulación obtenido por las superficies con calcio es al menos el mismo que el grado de coagulación del control positivo (es decir, al menos 1) y este valor no parece aumentar significativamente en el intervalo 1 - $3,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$. Sin embargo, a partir de $3,5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ se produce un descenso en el grado de coagulación final hasta el punto de que a partir de unos $5 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ se inhibe el proceso de coagulación por completo.

En definitiva, este ensayo ha servido para corroborar en superficie lo que se conocía en volumen, esto es, existe un rango de concentraciones superficiales de calcio que desencadenan un proceso de coagulación óptimo pero fuera de ese rango, la coagulación no se produce. Los recubrimientos comerciales basados en NaOH y NaCl, por carecer de calcio, tampoco son capaces de promover la coagulación.

5

Ensayo 5

Carácter promineralizante

10

1. *Objetivo*

El objetivo de este ensayo fue evaluar la capacidad de formación de fases de fosfato de calcio en las muestras sometidas al tratamiento superficial con calcio con el fin de determinar su capacidad para estimular la generación de apatita.

15

2. *Materiales y métodos*

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Scharlab S.L. Barcelona, España.

20

Por un lado se prepararon las superficies de los implantes. Para ello se utilizaron discos de 8 mm de diámetro por 3 mm de alto con una rugosidad $S_a = 0,7 \mu\text{m}$ y $S_{dr} = 35\%$. Dichos discos fueron lavados con tritón X-100, acetona y etanol, 20 min cada uno en ultrasonidos. Se tomaron medidas en diferentes puntos de 3 discos diferentes por tipo de superficie (con calcio, sin calcio).

25

Por otro lado se preparó la solución con calcio. Como soluto se utilizó $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dihidrato). Como solvente se utilizó etanol 95 wt.%.

30

Para realizar los recubrimientos, se depositó el volumen equivalente al arrastrado por implantes de superficie semejante para dar una concentración final de $2,4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$.

Para deposición de fases de fosfato de calcio asistida electroquímicamente (ECAD en sus siglas en inglés) se utilizó un potenciostato/galvanostato combinado PGSTAT T302N (Metrohm Autolab B.V., Utrecht, Holanda) acoplado a una celda electroquímica encamisada para asegurar una temperatura constante de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante la electrólisis. El electrodo de trabajo fue configurado en catódico y la polarización se llevó a cabo en modo galvanostático. Para el experimento se aplicó una densidad de corriente por cada muestra de $-15 \text{ mA}/\text{cm}^2$ durante 30 minutos. El electrolito usado para la deposición de fases de fosfato de calcio se preparó con concentraciones de 1,66 mM de CaCl_2 y 1 mM de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. El pH del electrolito se ajustó a 6,4 con NH_4OH .

40

Tras el tratamiento de mineralización, las muestras se enjuagaron cinco veces en agua desmineralizada para eliminar todos los restos lábiles y se dejaron secar al aire para su posterior análisis.

Para evaluar el nivel de mineralización de las muestras se utilizó un espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier FTIR, Nicolet® 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific®, Waltam, USA) con módulo de ATR (reflectancia total atenuada en sus siglas en inglés) para recubrimientos delgados. Se hicieron 32 escaneos por muestra en 5 puntos distintos de cada muestra para verificar la homogeneidad del recubrimiento.

45

3. *Resultados y discusión*

La rugosidad de las muestras y lo delgado del recubrimiento de fases de fosfato de calcio sobre las mismas hacen inviable la extracción de suficiente cantidad de muestra para realizar el análisis por pastilla de KBr. Es por ello que se ha utilizado el método de ATR. En el presente caso, la falta de información en el rango $400\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ debida al uso del método ATR no es relevante ya que ambos recubrimientos son de hidroxiapatita. La Figura 13 muestra los espectros de infrarrojo de las muestras con calcio y las muestras sin calcio. El desdoblamiento del pico de absorción de fosfato (ν_3 en 1020 y 1090 cm^{-1}), así como el hombro en 965 cm^{-1} , son característicos de la hidroxiapatita. El pequeño pico en 875 cm^{-1} se asigna a sustituciones de carbono en la red cristalina, lo que indica que se trata de una hidroxiapatita de tipo carbonatado. También el pico en 1420 cm^{-1} es indicador de este tipo de hidroxiapatita. Aunque en ambas muestras se ha obtenido hidroxiapatita carbonatada, en el caso de las muestras con calcio, la mayor intensidad de picos supone que, para las mismas condiciones experimentales, estos recubrimientos son capaces de provocar una mayor deposición de apatita. Los recubrimientos con calcio también han generado una hidroxiapatita mucho más hidratada, con el característico modo de vibración de los hidroxilos muy marcado hacia 3400 cm^{-1} . Otro aspecto a destacar en el caso de las muestras con calcio, además de la mayor intensidad de los picos, es la presencia de picos adicionales propios de las hidroxiapatitas carbonatadas (1460 y 1550 cm^{-1}) e hidratadas (1630 cm^{-1}) que no están presentes en las muestras sin calcio.

65

En definitiva, este ensayo ha servido para corroborar que los discos tratados previamente con calcio son capaces de producir una más rápida deposición de hidroxiapatita en la superficie que los discos sin tratamiento, en las mismas condiciones experimentales.

Ensayo 6

*Citotoxicidad*5 1. *Objetivo*

El objetivo del sexto ensayo fue evaluar biológicamente la toxicidad a las 24 horas de contacto con las células hFOB 1.19 de los recubrimientos con calcio según norma UNE-EN ISO 10993-5:2000.

10 2. *Materiales y métodos*

Por un lado se realizó un cultivo celular. Se cultivó la línea celular hFOB 1.19 (ATTC CRL 11372) en medio DMEM-F12 (Invitrogen 11039-021) completado con 10% Suero Fetal Bovino, 1% Penicilina-Streptomicina, 1% Glutamina, y 0,3 mg/mL de G418.

15 Por otro lado se prepararon las superficies, en forma de discos de 6 mm de diámetro por 3 mm de alto con una rugosidad $S_a = 0,7\mu\text{m}$ y $S_{dr} = 35\%$. Se lavaron con tritón X-100, acetona y etanol, 20 min cada uno en ultrasonidos. Se utilizaron 5 discos por concentración.

20 Se prepararon las soluciones, utilizando como soluto el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dihidrato) y como solvente Etanol 95 wt.%.

Se realizaron los recubrimientos: en los discos recubiertos con calcio, se depositó el volumen equivalente al arrastrado por implantes de superficie semejante para cada una de las concentraciones para dar unas concentraciones finales de 0,36; 1,79 y 3,26 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$.

25 En cuanto a la manipulación de las muestras, todas las muestras se sometieron a esterilización β 25-50 kGy. Como control negativo se utilizaron probetas de PVC y como control positivo, de PE alta densidad. Los controles fueron esterilizados mediante etanol. En condiciones estériles, las muestras se introdujeron en los pocillos de placas de 96 pocillos para después añadirles las células.

30 En cuanto a la línea celular y realización del ensayo, se hicieron crecer las células de la línea celular hFOB 1.19 y se obtuvo una suspensión celular. Se sembraron $1,5 \times 10^4$ células en medio/pocillo encima de las muestras a estudio. Se incubó la placa durante 24 horas a 37°C y 5% CO_2 . Se emplearon 5 réplicas para cada muestra/control y una réplica para cada muestra/control como “blanco” (medio de cultivo sin células) con el fin de determinar el ruido de fondo de cada muestra/control. Transcurrido el tiempo de contacto, se realizó la medida del número de células/muestra mediante el ensayo por WST-1*. Para ello, se añadieron 10 μl de WST-1/pocillo y se incubó durante 4 horas (37°C y 5% CO_2 , oscuridad). Finalmente, se retiró el medio de cada pocillo a otra placa y se leyó la absorbancia de la placa a 450 nm de longitud de onda en un lector de placas de absorbancia.

40 Para conocer el número de células/muestra, se debió realizar previamente una curva donde se relacionara un número de células conocido con la absorbancia obtenida mediante el método por WST-1. El método WST-1 es un método colorimétrico que detecta la actividad mitocondrial de las células.

45 En cuanto a la valoración del ensayo, los resultados se basaron en la evaluación cuantitativa de los cultivos después de las 24 horas de contacto. Se obtuvo el porcentaje de viabilidad celular para cada muestra ensayada en comparación a los resultados obtenidos para el control positivo.

$$\text{Viabilidad celular relativa (\%)} = \text{N}^\circ \text{ células muestra} / \text{N}^\circ \text{ células control (+)} \times 100$$

50 Se procedió al tratamiento estadístico de los resultados, aplicando el test estadístico t de Student para comprobar si las diferencias respecto al control positivo eran o no significativas estadísticamente ($p < 0,05$).

55 3. *Resultados y discusión*

La Figura 14 muestra los resultados del ensayo de citotoxicidad según la norma UNE-EN ISO 10993-5:2000, mostrando más concretamente la viabilidad celular relativa al control positivo, tras 24 h de exposición a las superficies sin calcio (TiO_2) y con calcio (1,79 y 3,26 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$). Ninguna de las superficies evaluadas es citotóxica para las células osteoblásticas utilizadas, ya que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los resultados del control positivo y las muestras y ninguna de ellas rebasa el umbral de citotoxicidad (70% de viabilidad relativa). El depósito de calcio superficial no parece tener efectos negativos sobre la adhesión celular y su viabilidad a las 24 h de cultivadas. Al ser recubrimientos altamente higroscópicos, se podría temer que estas superficies pudieran romper las paredes celulares al someterlas a una elevada presión osmótica. También se podría pensar en una saturación de receptores de membrana por exceso de calcio. El presente ensayo descarta tales efectos. Precisamente, la elevada higroscopicidad del recubrimiento con calcio hace que este se hidrate rápidamente con moléculas de agua del entorno, de manera que en el momento del contacto con las células y el medio celular, el gradiente osmótico baje a niveles inocuos en términos de lisis celular.

Conclusiones de los ensayos

La presente invención permite obtener recubrimientos homogéneos de calcio sobre sustratos de titanio con muy poca dispersión en su distribución superficial. El acopio de sales de calcio del solvente es casi inmediato y no aumenta con el tiempo de exposición al mismo pero sí con la concentración de soluto en el solvente. El carácter higroscópico del cloruro de calcio permite formar en la superficie una capa hidratada que evita el efecto “hidrofobizante” debido a la contaminación atmosférica del óxido de titanio con hidrocarburos atmosféricos. Esta protección es duradera en el tiempo. Además, estos recubrimientos otorgan a las superficies un carácter superhidrofílico a partir de concentraciones de calcio por unidad de superficie relativamente bajas. Sólo se perciben ligeras pérdidas de hidrofiliidad, en el caso de ejercer lavados muy fuertes y, aún así, las superficies tienen un carácter más hidrofílico que aquéllas no recubiertas originalmente con calcio. Estos recubrimientos tienen como particularidad que pueden disolverse en presencia de líquidos polares como la sangre o el plasma. Siendo el calcio un componente básico en la cascada de coagulación y su desencadenamiento, estas superficies tienen como característica principal la de provocar la coagulación al entrar en contacto con los fluidos biológicos mencionados. Este proceso es dependiente de la concentración de calcio y, por lo tanto, en este documento se especifica un rango de concentraciones superficiales de calcio en el cual la coagulación se realiza de manera óptima: en el caso de tratar con CaCl_2 , entre 0,70 a 3,5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ o concentraciones de la solución de partida entre 100 y 1000 mM. El estudio de mineralizabilidad (carácter promineralizante) demuestra una mayor capacidad de los recubrimientos de calcio para formar apatita en comparación con las superficies no recubiertas. Por último, el estudio de citotoxicidad descarta cualquier efecto negativo de estos recubrimientos sobre células osteoblásticas.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Implante para cuerpo humano o animal, que se **caracteriza** por que su superficie externa comprende al menos una sal de calcio soluble en líquido polar.
2. Implante, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que su superficie externa comprende sal de calcio en estado sólido.
- 10 3. Implante, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que su superficie externa comprende los iones de dicha sal de calcio disociados.
4. Implante, según la reivindicación 1, que se **caracteriza** por que su superficie externa comprende al menos una sal de calcio soluble en líquido polar en estado parcialmente disociado.
- 15 5. Método de modificación de la superficie de un implante, que se **caracteriza** por que comprende los pasos de:
- sumergir el implante en una solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar,
 - 20 - extraer el implante, de manera que sobre su superficie queda depositada una sal de calcio soluble en líquido polar,
 - almacenar el implante en un envase en cuyo interior existe un ambiente seco, quedando el implante en contacto con dicho ambiente seco.
- 25 6. Método, según la reivindicación 5, que se **caracteriza** por que el envase donde se almacena el implante se encuentra al vacío.
- 30 7. Método, según la reivindicación 5, que se **caracteriza** por que el envase contiene un agente desecante de mayor poder higroscópico que el compuesto cálcico de la superficie del implante.
8. Método de modificación de la superficie de un implante, que se **caracteriza** por que comprende los pasos de:
- 35 - sumergir el implante en una solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar,
 - extraer el implante, de manera que sobre su superficie queda depositada una sal de calcio soluble en líquido polar,
 - 40 - almacenar el implante en un envase en cuyo interior existe una atmósfera ambiente, quedando el implante en contacto con dicha atmósfera ambiente.
9. Método, según la reivindicación 5 ó 8, que se **caracteriza** por que el implante se sumerge en la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar durante al menos 5 segundos.
- 45 10. Método, según la reivindicación 5 ó 8, que se **caracteriza** por que un soluto de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar es cloruro de calcio y el solvente es etanol.
- 50 11. Método, según la reivindicación 5 ó 8, que se **caracteriza** por que tras extraer el implante de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar y antes de ser almacenado, se ejecuta el paso adicional de secar el implante.
- 55 12. Método, según la reivindicación 11, que se **caracteriza** por que el secado se realiza mediante uno o varios de los siguientes métodos: aplicación de calor, aplicación de desecado y aplicación de vacío.
13. Método, según la reivindicación 5 ó 8, que se **caracteriza** por que la concentración de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar está entre 20 y 2000 mM.
- 60 14. Método, según la reivindicación 13, que se **caracteriza** por que la concentración de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar está entre 100 y 1000 mM.
- 65 15. Método de modificación de la superficie de un implante, que se **caracteriza** por que comprende el paso de almacenar el implante en un envase que contiene una solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar, almacenándose el implante en contacto con dicha solución y aislado del exterior, donde la concentración de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar está entre 20 y 2000 mM.

16. Método, según la reivindicación 15, que se **caracteriza** por que la concentración de cloruro de calcio en la solución está entre 100 y 1000 mM.

5 17. Método, según la reivindicación 5, 8 ó 15, que se **caracteriza** por que un soluto de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar es cloruro de calcio y el solvente es agua desmineralizada.

18. Método, según la reivindicación 5, 8 ó 15, que se **caracteriza** por que un soluto de la solución de al menos una sal de calcio soluble en líquido polar es acetato de calcio y el solvente es agua desmineralizada.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

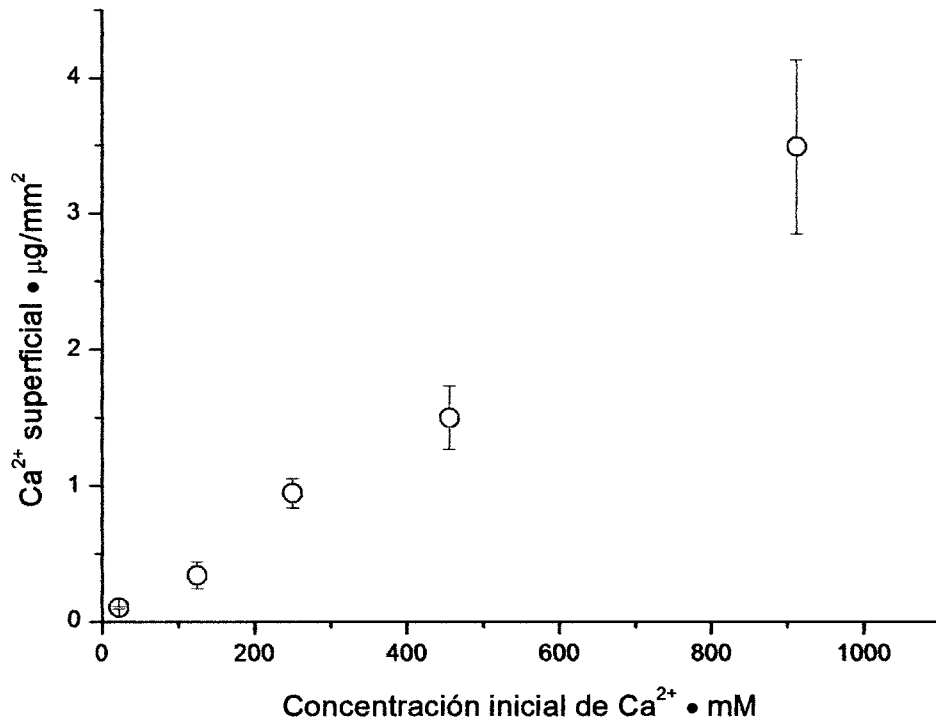


FIG.1

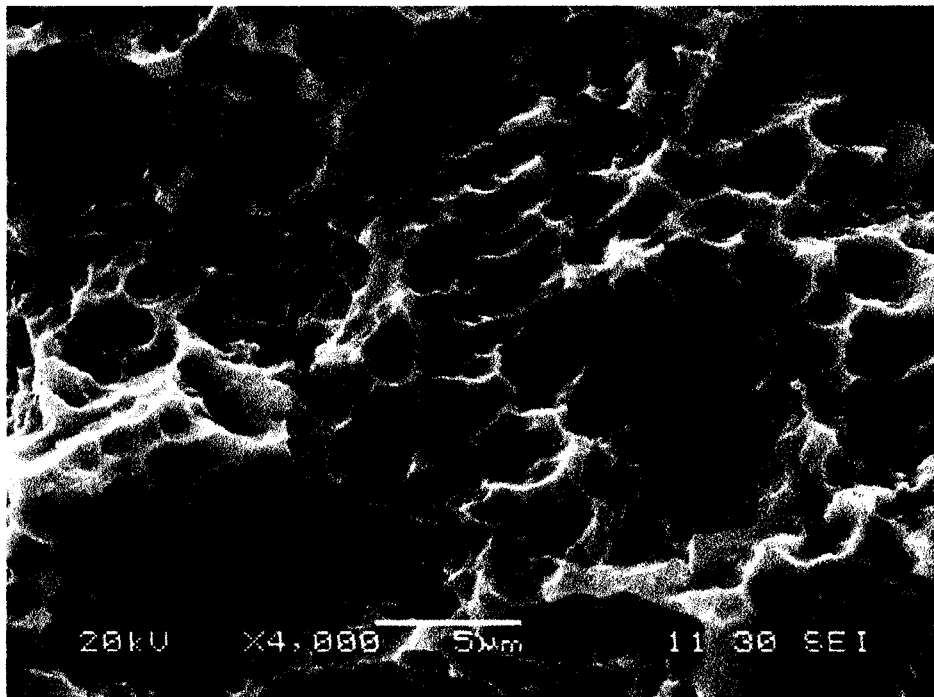


FIG.2

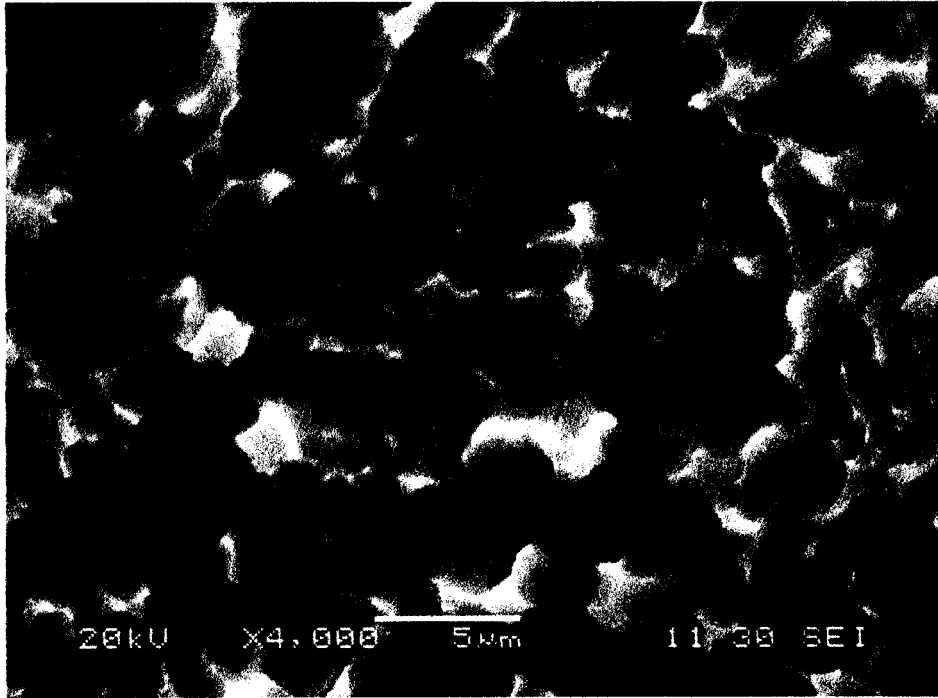


FIG.3

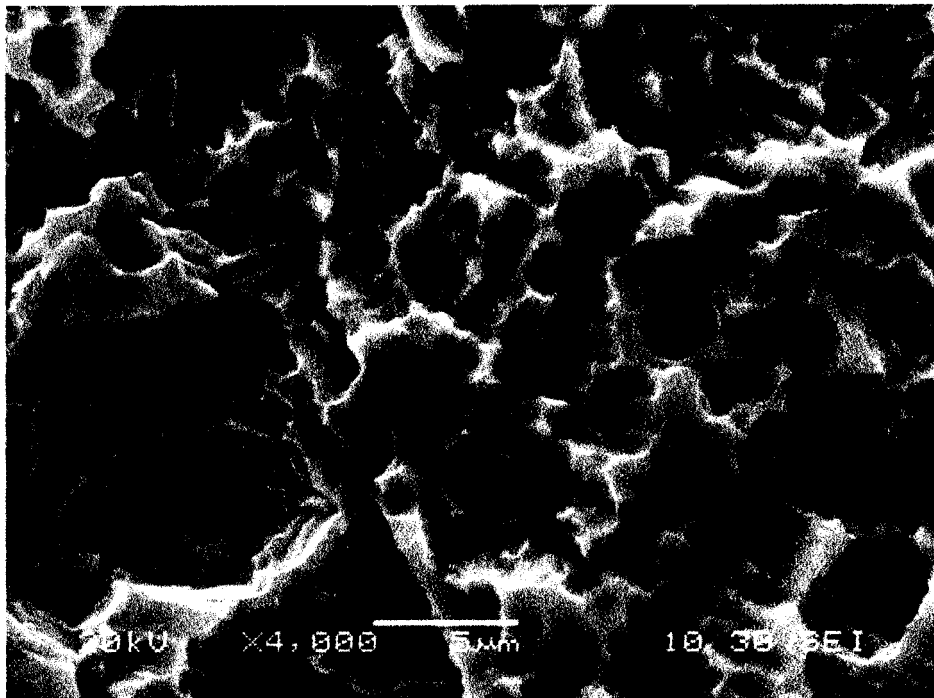


FIG.4

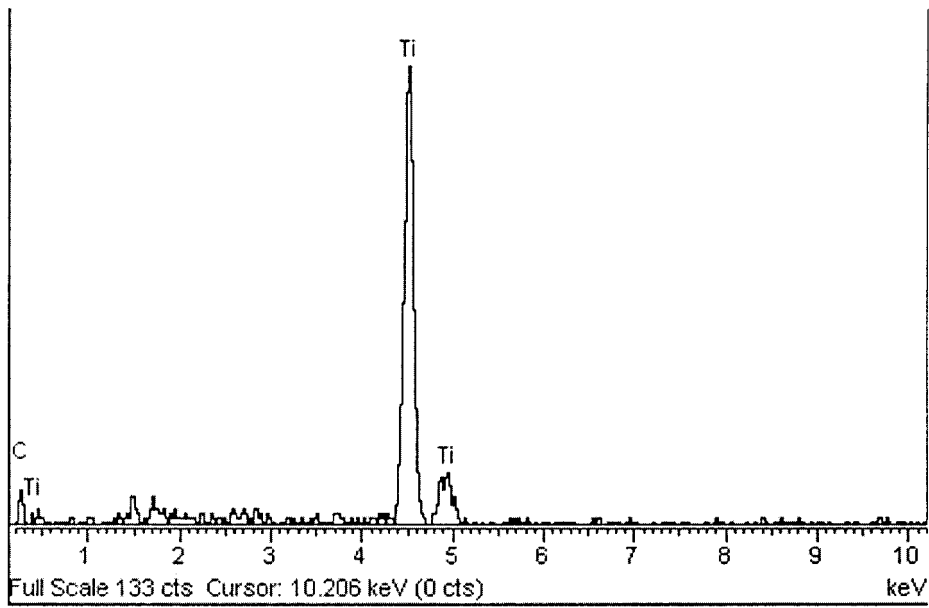


FIG.5

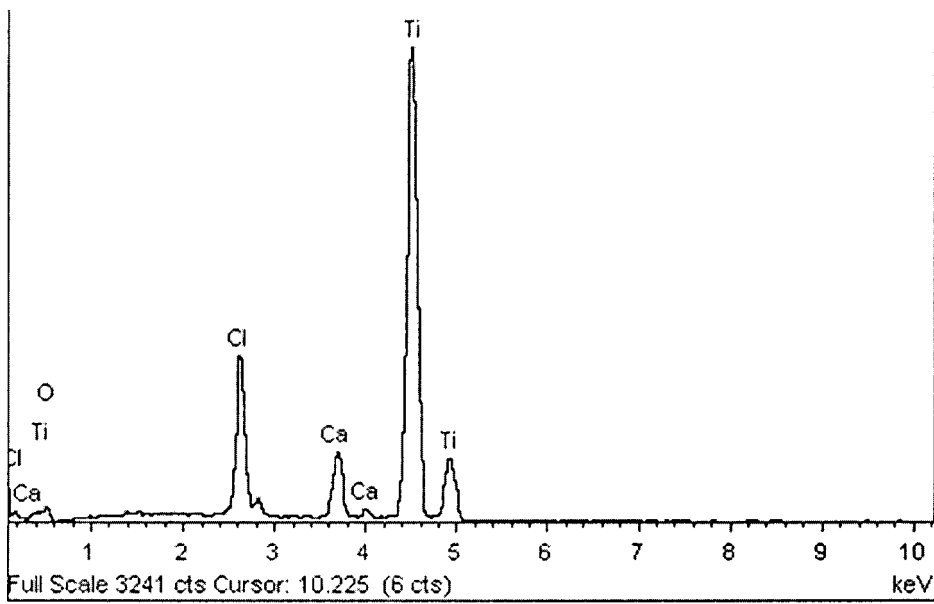


FIG.6

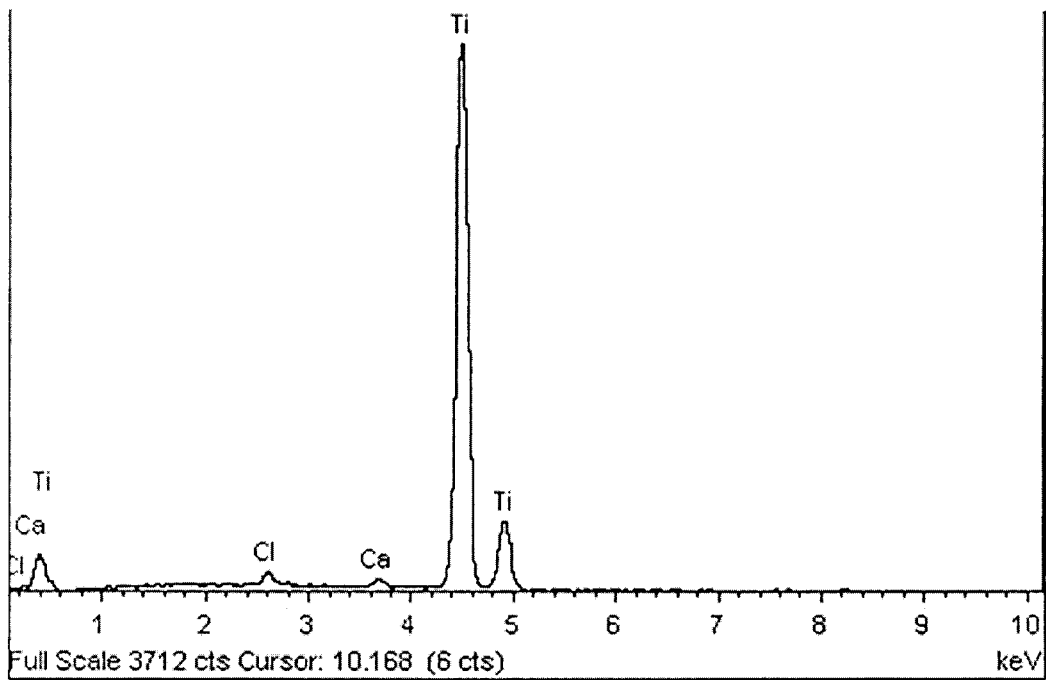


FIG.7

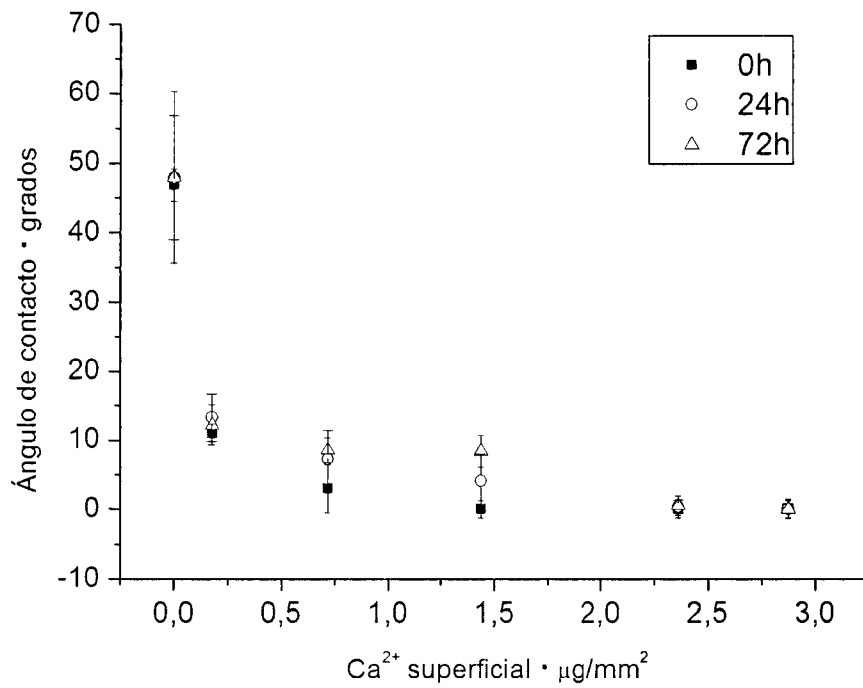


FIG.8

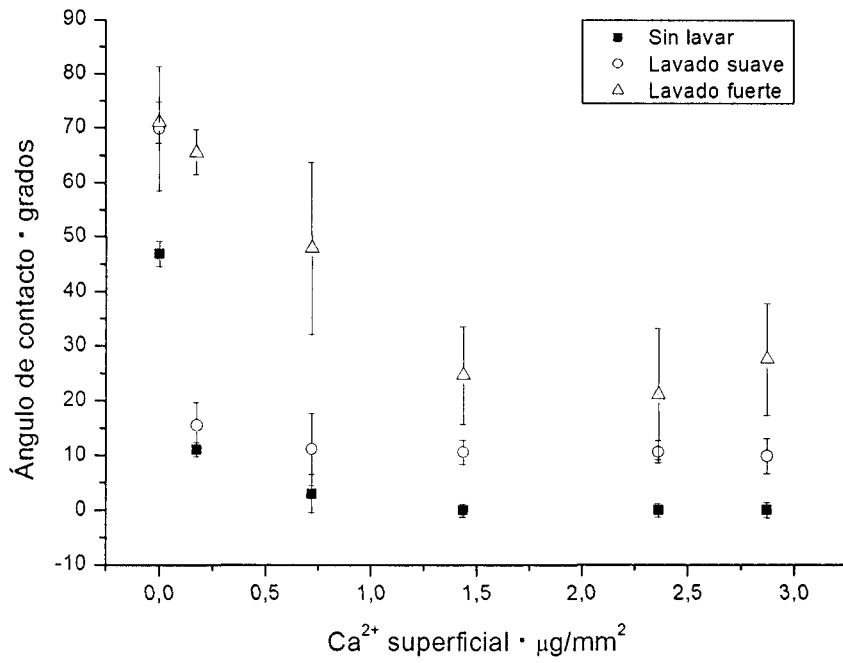


FIG.9

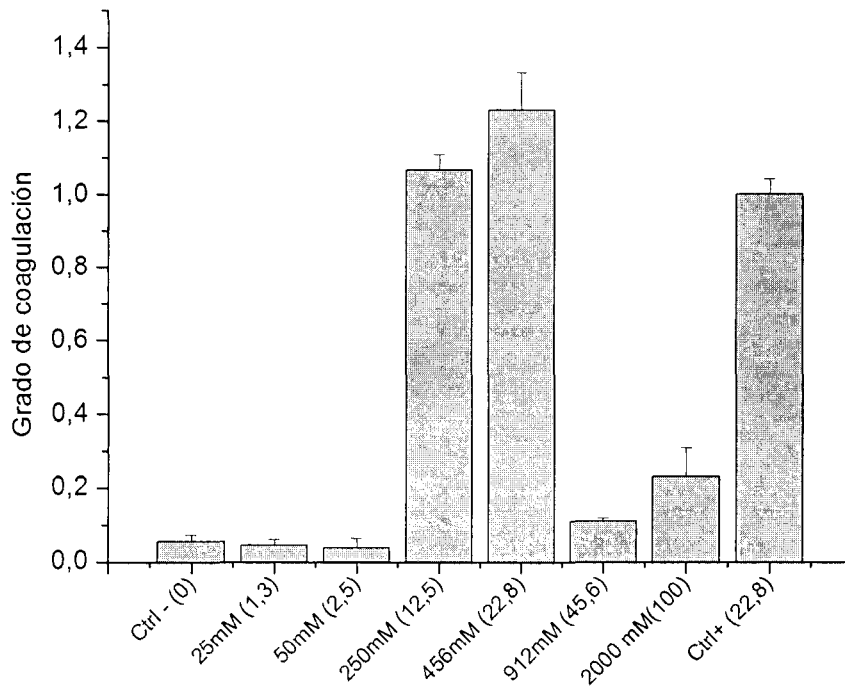


FIG.10

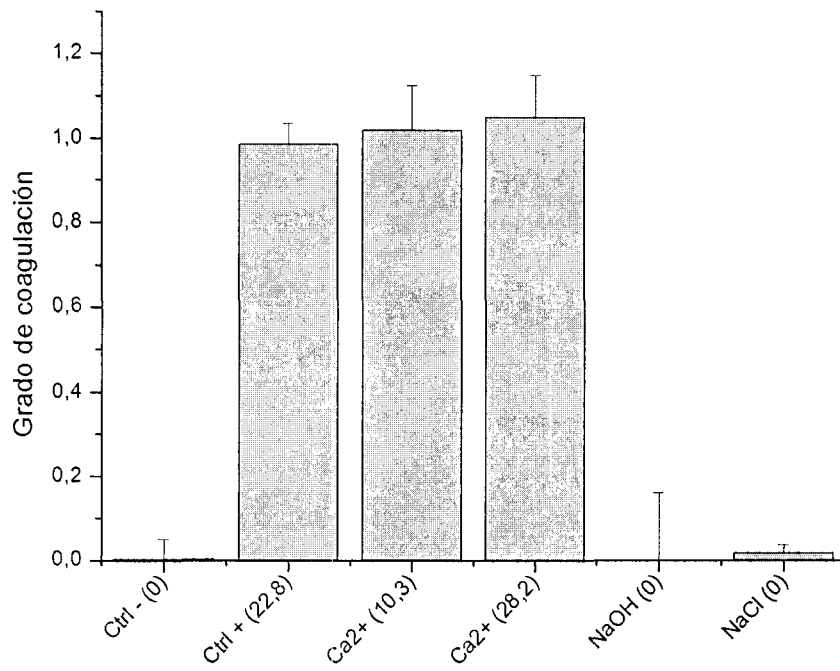


FIG.11

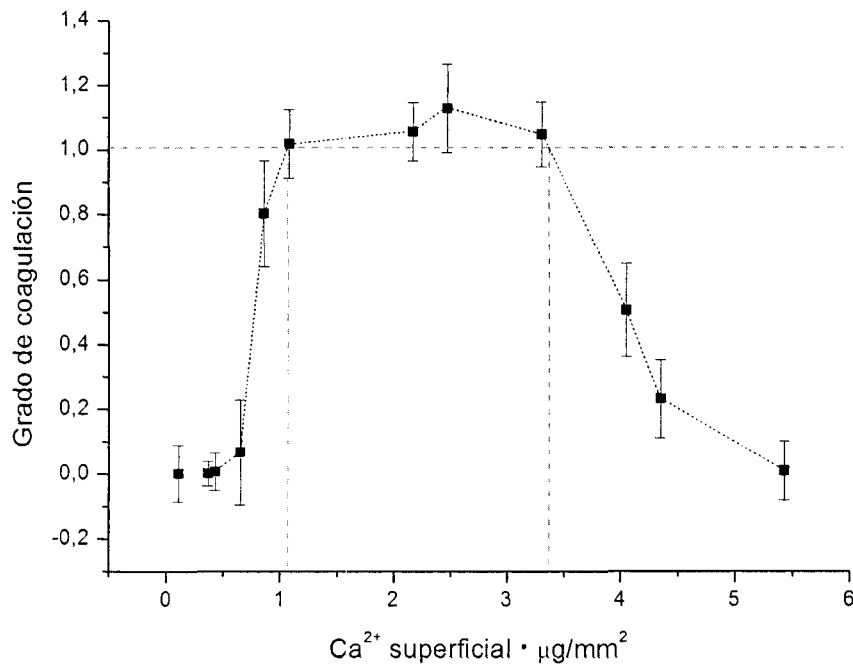


FIG.12

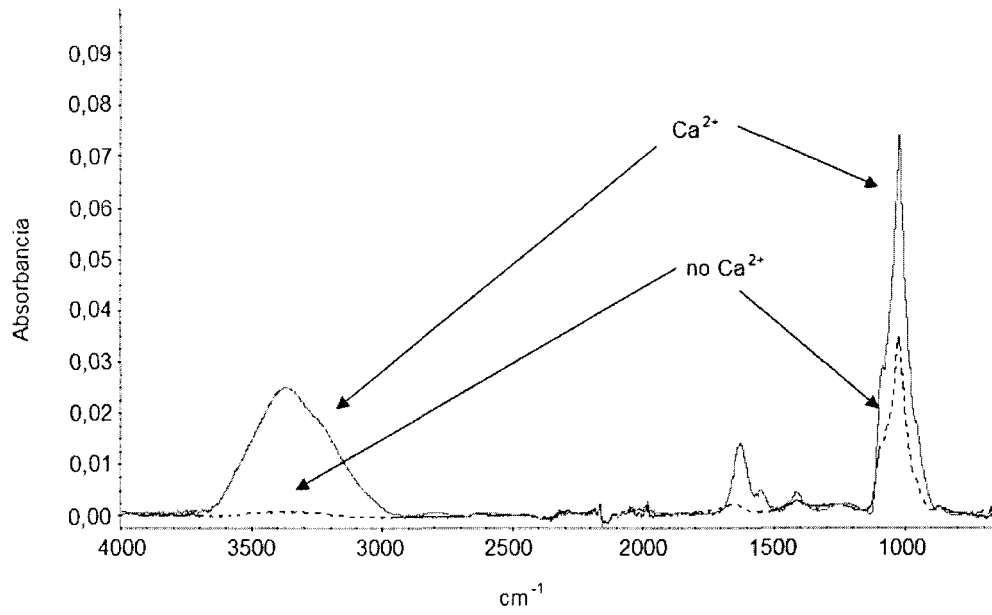


FIG.13

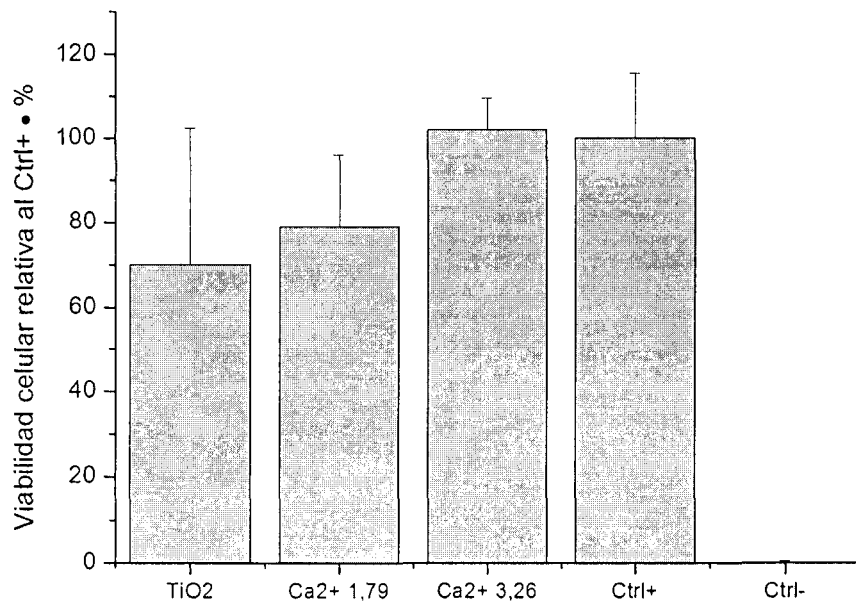


FIG.14



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201001192

②² Fecha de presentación de la solicitud: 16.09.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2009097218 A1 (BIOMET 3I LLC et al.) 06.08.2009, párrafos 2-3,5-6,10,40,52,87-91; figura 5.	1-12,17-18
X	US 2009132048 A1 (CAMLOG BIOTECHNOLOGIES AG) 21.05.2009, párrafos 1,9-11,13-15,17-18,29-30; reivindicaciones 21-24,38-42,44.	1-12,17-18
X	US 2007299535 A1 (BIOMED EST) 27.12.2007, párrafos 21-22,29; reivindicaciones 1-3,5,12.	1-12
X	US 2005161440 A1 (ASTRAZENECA) 28.07.2005, párrafos 23,32,43-49.	1-2,8-9,17-18
A	US 2003176927 A1 (STRAUMANN HOLDING AG) 18.09.2003, párrafos 8-12,55,60-63.	1,15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.01.2011

Examinador
A. Urrecha Espluga

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61F2/02 (01.01.2006)

A61L27/30 (01.01.2006)

A61F2/28 (01.01.2006)

A61F2/30 (01.01.2006)

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

A61F, A61L

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS, NPL, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5-7,9-10,13-16,18	SI
	Reivindicaciones 1-4,8,11-12,17	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 13-16	SI
	Reivindicaciones 1-12,17-18	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2009097218 A1 (BIOMET 3I LLC et al.)	06.08.2009
D02	US 2009132048 A1 (CAMLOG BIOTECHNOLOGIES AG)	21.05.2009
D03	US 2007299535 A1 (BIOMED EST)	27.12.2007

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

El objeto de la invención es un implante para el cuerpo humano o animal que en su superficie externa comprende al menos una sal de calcio soluble en un líquido polar y el método de modificación de la superficie del implante.

El documento D01 divulga un método para mejorar la osteointegración e hidrofiliidad de un implante dental hecho de titanio o aleaciones de titanio. El método comprende la deposición de sales no tóxicas en la superficie del mismo, para ello se sumerge el implante en la disolución salina y a continuación se seca y se envasa. Las sales pueden ser NaCl, KCl, CaCl₂ o lactato de sodio (párrafos 2-3, 5-6, 10, 40, 52, 87-91, figura 5).

Por tanto, las reivindicaciones 1-4, 8, 11-12 y 17 carecen de novedad a la luz de lo divulgado en D01 (Art. 6 LP).

El documento D02 divulga un implante dental de titanio o de una aleación de titanio recubierto por una capa protectora de sal que se disuelve en contacto con un fluido corporal favoreciendo así la osteointegración del mismo e impidiendo su contaminación. Los cationes de la sal pueden ser Na⁺, K⁺, Mg⁺², Ca⁺² y los aniones cloruro o fosfato. El método utilizado para recubrir el implante comprende la inmersión del implante en la disolución salina y el posterior secado del implante que se almacena en un envase (párrafos 1,9-11, 13-15, 17-18, 29-30; reivindicaciones 21-24, 38-42,44).

En consecuencia, las reivindicaciones 1-4, 8, 11-12 y 17 carecen de novedad a la luz de lo divulgado en D02 (Art. 6 LP).

El documento D03 divulga un implante de hueso con un recubrimiento de una sal de calcio (sulfato de calcio) que se disuelve cuando se implanta. El procedimiento para recubrir el implante comprende la inmersión del implante en la disolución salina y el posterior secado del implante (párrafos 21-22, 29; reivindicaciones 1-3, 5, 12).

Por tanto, las reivindicaciones 1-4, 8, 11 y 12 carecen de novedad a la luz de lo divulgado en D03 (Art. 6 LP).

A la luz de lo divulgado en D01, D02 y D03 (considerados de forma independiente) las reivindicaciones 5, 9-12, y 18 se consideran ligeras variantes de las condiciones de proceso que están dentro del alcance del experto en la materia. En consecuencia, carecen de actividad inventiva (Art. 8 LP).

Ninguno de los documentos citados, ni ninguna combinación relevante de los mismos divulga un método para modificar la superficie de un implante que se caracterice por almacenar el implante sumergido en una disolución de al menos una sal de calcio soluble en un líquido polar con una concentración de 20-2000mM, preferiblemente 100-1000mM, de manera que gracias a dicha concentración de calcio el implante presente propiedades procoagulantes. Tampoco se divulga un método para modificar la superficie de un implante que comprenda las etapas de sumergir el implante en una disolución de al menos una sal de calcio soluble en un líquido polar con la concentración antes mencionada, y a continuación extraerlo y almacenarlo, de manera que el implante así obtenido además de ser hidrofílico, estar protegido frente a la corrosión y presentar propiedades promineralizantes (características conocidas en el estado de la técnica) presente propiedades procoagulantes.

Por tanto, el objeto técnico de las reivindicaciones 13-16 es nuevo e implica actividad inventiva (Art. 6 y 8 LP).