



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 895**

51 Int. Cl.:  
**A61L 27/22** (2006.01)  
**A61L 27/30** (2006.01)  
**A61L 27/50** (2006.01)  
**A61L 27/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08708969 .4**  
96 Fecha de presentación : **13.02.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2121058**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Método para producir implantes almacenables dotados de una superficie ultrahidrófila.**

30 Prioridad: **14.02.2007 DE 10 2007 007 865**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.06.2011**

73 Titular/es: **Herbert Jennissen**  
**Alte Klosterstrasse 19**  
**50858 Köln, DE**

72 Inventor/es: **Lüers, Steffen;**  
**Laub, Markus y**  
**Jennissen, Herbert**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 361 895 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para producir implantes almacenables dotados de una superficie ultrahidrófila

5 La presente invención se refiere a un método para producir implantes almacenables dotados de una superficie ultrahidrófila, así como a los implantes producidos de tal modo. Además se describen métodos para preparar superficies cargadas, denominadas bioactivas, de materiales metálicos o cerámicos, que se usan para implantes tales como huesos y articulaciones artificiales, implantes dentales, o también de mínimo tamaño, p.ej. los llamados "stents", así como otros implantes que no son objeto de la presente invención, producidos según dichos métodos y conocidos como dispositivos de liberación, que permiten una cesión controlada, p.ej. mediante disociación, de las moléculas bioactivas de los materiales del implante.

15 La implantación de articulaciones y huesos artificiales ha ganado una importancia creciente en los últimos años, p.ej. para el tratamiento de displasias o luxaciones articulares o de enfermedades que pueden aparecer por deterioro de las articulaciones a consecuencia de malposiciones articulares. La función de los implantes y los materiales para su producción, que además de metales como el titanio o aleaciones también pueden comprender materiales cerámicos o plásticos como el teflón o las polilactidas, se han mejorado continuamente, de manera que en el 90-95% de los casos, tras un proceso curativo exitoso, los implantes pueden acreditar una duración de 10 años.

20 A pesar de estos progresos y de la mejora de los métodos operativos un implante todavía supone una intervención difícil y onerosa, sobre todo porque va acompañado de un proceso de cicatrización del implante que es muy lento y suele requerir meses de hospitalización y curas, incluyendo las medidas de rehabilitación. Aparte de los dolores, a los pacientes afectados les resulta muy molesta la duración del tratamiento y la separación del entorno habitual. Además, como el proceso de curación es largo y requiere muchos cuidados, los costes de personal y de asistencia son elevados.

30 En los últimos años se ha ampliado significativamente la comprensión de los procesos a nivel molecular que son necesarios para la buena incorporación de un implante. Para que un implante sea compatible con los tejidos es decisiva la compatibilidad estructural y la compatibilidad superficial. En sentido estricto la biocompatibilidad solo depende de la superficie. Las proteínas son determinantes en todos los niveles de integración. Como se explica a continuación ya lo son durante la operación del implante gracias a la formación de una capa proteica inicial absorbente y al desarrollo posterior de la cicatrización, pues esta capa es colonizada más tarde por las primeras células.

35 Durante la interacción molecular entre el implante, también denominado biomaterial, y el tejido tienen lugar múltiples reacciones que parecen estar ordenadas de manera estrictamente jerárquica. Como primera reacción biológica se produce la adsorción de proteínas a la superficie del biomaterial. A continuación, en la capa proteica resultante hay moléculas individuales de proteína que se transforman en sustancias señalizadoras presentes en la superficie, por ejemplo mediante variaciones de conformación, o que se liberan mediante reacciones catalíticas (proteolíticas) en forma de fragmentos proteicos que actúan como sustancias señalizadoras.

40 En la fase siguiente tiene lugar la colonización celular activada por las sustancias señalizadoras, la cual puede comprender un gran número de células como leucocitos, macrófagos, inmunocitos y por último también células de tejidos (fibroblastos, fibrocitos, osteoblastos, osteocitos). En esta fase juegan un papel decisivo otras sustancias señalizadoras, llamadas mediadores, como p.ej. citosinas, quimiocinas, morfógenos, hormonas tisulares y hormonas genuinas. Finalmente, en caso de biocompatibilidad se produce la integración del implante en todo el organismo y se obtiene idealmente un implante permanente.

50 A la luz de trabajos realizados en los últimos años a nivel osteogénico han cobrado una importancia creciente unos señalizadores químicos, llamados "proteínas morfógenas óseas" (BMP-1-BMP-15), que tienen influencia en el crecimiento óseo. Las BMPs (sobre todo BMP-2 y BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7) son proteínas osteoinductoras que estimulan la neoformación y reparación ósea mediante la proliferación y diferenciación de células precursoras en osteoblastos. Además promueven la formación de fosfatasa alcalina, receptores hormonales, sustancias específicas del hueso como el colágeno de tipo 1, osteocalcina, osteopontina y finalmente la mineralización.

55 Las moléculas de BMP regulan las tres reacciones clave, quimiotaxis, mitosis y diferenciación, de las respectivas células precursoras. Además las BMPs juegan un papel importante en la embriogénesis y organogénesis del hueso y de otros tejidos, conociéndose como células finales los osteoblastos, los condroblastos, los mioblastos y las células vasculares de músculo liso (cuya proliferación es inhibida por BMP-2).

60 Hasta ahora se conocen 15 BMPs, incluyendo múltiples isoformas. Excepto la BMP-1, las BMPs pertenecen a la superfamilia de los "factores de crecimiento transformante beta" (TGF- $\beta$ ), para la cual se han detectado receptores específicos en las superficies de las respectivas células. El buen resultado del uso de BMP-2 y/o BMP-7 recombinante humana en ensayos con procesos de curación defectuosa en ratas, perros, conejos y monos ha demostrado que al parecer no existe ninguna especificidad relativa a la especie.

65 Sin embargo los ensayos efectuados hasta la fecha, consistentes en aplicar la BMP-2 y/o la BMP-7 directamente

sobre biomateriales metálicos o cerámicos, a fin de aprovechar el poder activador de las BMPs para la formación de hueso, de cara a las implantaciones, no han dado en general buen resultado.

5 Del estado técnico se conoce una serie de trabajos en el campo de los materiales de implante revestidos. Así, la patente WO 9926674 describe un método para preparar superficies bioactivas para implantes de materiales metálicos o cerámicos, según el cual en una primera etapa se unen covalentemente moléculas de anclaje a la superficie del material del implante y en una segunda etapa se unen covalentemente péptidos a las moléculas de anclaje.

10 En la patente WO 020978 se ofrece un método para preparar superficies bioactivas para implantes de materiales metálicos o cerámicos, según el cual en una primera etapa se unen covalentemente moléculas de anclaje con radicales hidrófobos a la superficie del material del implante y en una segunda etapa se superponen péptidos al material del implante así tratado, los cuales son inmovilizados debido a interacciones no covalentes entre los péptidos y los radicales hidrófobos de las moléculas de anclaje.

15 Por tanto según ambos documentos es preciso inmovilizar químicamente sobre la superficie del implante moléculas de anclaje que luego se unan a los péptidos por enlace químico covalente o a la superficie del implante mediante interacciones no covalentes. Los resultados de ensayo de los inventores demostraron que habían fracasado las pruebas para inmovilizar péptidos a la superficie del implante sin moléculas de anclaje.

20 Por parte de los inventores se encontró ahora sorprendentemente - con especial referencia a estos primeros ensayos de inmovilización de los inventores - que es posible inmovilizar péptidos sobre superficies metálicas, sobre todo factores de crecimiento de la clase TGF, p.ej. proteínas BMP, si sobre el material de implante se puede preparar una superficie que sea suficientemente hidrófila. Por parte de los inventores se encontró que esto es factible, si se crea una capa de óxido ultrahidrófila sobre la superficie metálica por tratamiento con un agente oxidante.

25 Los inventores han comprobado que las superficies de gran nivel energético pueden mostrar una fuerte bioadhesión a los tejidos. Como las superficies de nivel energético elevado presentan en general pequeños ángulos de contacto con el agua, una superficie de este tipo se puede identificar muy fácilmente midiendo los ángulos de contacto dinámico. Los ángulos de contacto pequeños denotan una gran humectabilidad de la superficie.

30 En los ángulos de contacto dinámico se distingue un ángulo de avance ( $\theta_a$ ) de un ángulo de retroceso ( $\theta_r$ ) y la diferencia entre ellos se denomina histéresis del ángulo de contacto. Ahí el ángulo de avance es característico de las propiedades hidrófilas-hidrófobas de una superficie y corresponde en gran medida al llamado ángulo de contacto estático. En general cuanto mayor es la histéresis, mayor es la heterogeneidad de la superficie. Las superficies de titanio pulidas mecánicamente o eléctricamente suelen tener ángulos de contacto dinámico (ángulos de avance) de 70-80° y según la literatura especializada poseen una menor bioadhesión a los tejidos. Por tanto, según la exposición de los inventores, también es conveniente preparar superficies con pequeños ángulos de contacto sobre metales.

40 Según la presente invención las superficies con ángulos de contacto dinámico de 0 hasta 10° se definen como "ultrahidrófilas". Al mismo tiempo presentan una nanoestructura característica. En trabajos experimentales con animales los inventores pudieron demostrar que al cabo de 4 semanas la densidad ósea alrededor de un implante "ultrahidrófilo" es el doble que alrededor del implante de control.

45 En el estado técnico ya se han descrito según la patente EP 1 150 620 implantes con superficies hidrófilas chorreadas con arena y atacadas con ácido, sobre las cuales se midieron ángulos de humectación con agua entre 20-50°. Estas superficies se designaron como "hidrófilas" y se pudieron conservar en ciertas soluciones salinas. No obstante según la patente EP 1 150 620 se observó que tales superficies eran sensibles a una concentración creciente de sal.

50 Además en el estado técnico se sabe desde hace muchos años que las superficies metálicas hidrófilas, por ejemplo de titanio, no son estables y se vuelven de nuevo hidrófobas espontáneamente. El estado químico de la superficie de titanio y de aleaciones a base de titanio es complejo. Se presupone que la superficie metálica de titanio se oxida espontáneamente en aire y agua y que luego en dicha superficie, es decir en la capa atómica externa del óxido, tiene lugar una reacción con agua, formándose grupos hidroxilo.

55 A la vez estas superficies son especialmente sensibles a una esterilización por rayos gamma, un método que hoy se usa en todo el mundo para elaborar implantes clínicos. En el estado técnico se ha comprobado que las capas de dióxido de titanio se pueden hidrófilizar por irradiación lumínica. Estas capas también pierden su carácter hidrófilo al cabo de poco tiempo y se vuelven de nuevo hidrófobas, pero el mecanismo exacto de esta variación todavía no está claro.

60 Por tanto se necesita un método que permita la elaboración de implantes con capas superficiales ultrahidrófilas de estabilidad ilimitada y resistencia a la esterilización.

65 Los inventores también describen aquí un método para elaborar un implante con una superficie ultrahidrófila, que consiste en tratar la superficie del implante con un agente oxidante, a fin de crear una capa de óxido sobre la superficie del metal, hasta obtener una histéresis del ángulo de contacto inferior a 10°, preferiblemente inferior a 5°, al

mojar con agua la superficie del implante, el cual es de un material seleccionado del grupo formado por metales, aleaciones metálicas y sus combinaciones con materiales cerámicos.

El implante metálico es preferiblemente de un material elegido del grupo formado por metales, aleaciones metálicas y sus combinaciones con materiales cerámicos. El material empleado para el implante es preferiblemente de tipo metálico, como titanio puro o aleaciones metálicas de titanio, aleaciones de cromo/níquel/aluminio/vanadio/cobalto (p.ej. TiAlV4, TiAlFe2,5), aceros inoxidable (p.ej. V2A, V4A, cromo-níquel 316L) o una combinación de ellos con materiales cerámicos tales como hidroxiapatito, óxido de aluminio, en la cual el material metálico está compuesto con material cerámico.

El método permite preparar superficies metálicas ultrahidrófilas. Para ello se trata la superficie del implante metálico con un agente oxidante, a fin de crear una capa de óxido sobre la superficie del metal, hasta obtener una histéresis del ángulo de contacto inferior a  $10^\circ$ , preferiblemente inferior a  $5^\circ$ , con mayor preferencia inferior a  $1^\circ$ , sobre todo inferior a  $0,5^\circ$ , al mojarla con agua pura (destilada).

Este tratamiento dura preferiblemente hasta que la histéresis del ángulo de contacto queda en la zona del mínimo en el diagrama donde se representa la histéresis del ángulo de contacto frente a la duración del tratamiento oxidante.

Esto se puede conseguir tratando la superficie del implante metálico con un agente oxidante del modo siguiente: el implante metálico, preferiblemente desengrasado, se somete a un choque térmico en ácido cromosulfúrico caliente – que tenga preferentemente una densidad mayor de  $1,40 \text{ g/cm}^3$  – a una temperatura superior a  $200^\circ\text{C}$ , es decir, en pocos segundos se calienta por inmersión a la temperatura del ácido cromosulfúrico y se deja a esta temperatura durante 10 hasta 90 minutos, preferiblemente hasta 60 minutos, con especial preferencia hasta 30 minutos y luego, inmediatamente después de extraerlo, se enfría hasta la temperatura ambiente en un tiempo inferior a un minuto, preferiblemente en pocos segundos, lo cual puede lograrse, preferentemente, por enfriamiento brusco al sumergirlo en ácido sulfúrico concentrado a una temperatura de  $15^\circ\text{C}$  hasta  $25^\circ\text{C}$ . Para eliminar los restos de ácido y, si los hubiere, iones metálicos ajenos al implante, p.ej. iones de cromo, la superficie del implante metálico se lava varias veces (hasta 15) con agua destilada. Si después todavía se detectan iones de cromo sobre la superficie del implante metálico, éste puede tratarse con una solución de un agente complejante hasta que ya no se encuentren más iones metálicos. Los inventores encontraron sorprendentemente que al usar EDTA como agente complejante la solución adquiriría un color pardovioleta al disolverse cromo de las muestras. En tal caso los inventores proponen lavar las muestras en EDTA al 10% (1-3 x) a pH 7, si es necesario incluso en disolución de EDTA hirviendo, hasta que ya no aparezca ninguna coloración por iones de cromo.

Así pues, este proceso permite obtener un implante con una superficie ultrahidrófila, el cual puede hacerse estable al almacenamiento según el método de la presente invención.

Para ello los inventores han realizado pruebas que dieron resultados sorprendentes en comparación con las teorías conocidas del estado técnico. Como los embalajes húmedos para conservar superficies hidrófilas sobre implantes son costosos y sorprendentemente los implantes metálicos ultrahidrófilos son estables al almacenamiento, incluso a concentraciones de sal mayores de  $0,5 \text{ M/l}$ , sin merma de la humectabilidad, también se estudiaron procedimientos de embalaje exentos de líquidos. Se encontró sorprendentemente que las superficies ultrahidrófilas de titanio sobre las que se dejaron evaporar disoluciones salinas eran estables frente a la pérdida de humectabilidad. Entre estas disoluciones cabe mencionar, por ejemplo, soluciones 1 M de sales neutras, como NaCl 1 M o incluso EDTA 5 mM de pH 7,0. Como solución especialmente adecuada dio buen resultado una mezcla tampón con contenidos de:

NaCl 120 hasta 150 mM  
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7,5 hasta 8,5 mM  
 KCl 2,5 hasta 3,5 mM  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 hasta 2,0 mM

a un valor de pH 7.2 hasta 7,6.

La evaporación puede tener lugar bajo atmósfera de gas protector o en aire atmosférico, siendo esta última la que se practica normalmente por cuestión de facilidad.

Sobre la superficie metálica así tratada se formó tras la evaporación una capa macroscópica fina e invisible, “capa deshidratada”, que según la presente invención estabiliza y protege la ultrahidrofilia. En general, según la presente invención, se pueden utilizar soluciones salinas neutras de una o varias sales a una concentración y en una cantidad que sea inerte frente a la superficie ultrahidrófila y suficiente para que la superficie del implante quede cubierta por la capa deshidratada tras la evaporación. La evaporación se puede efectuar cuando el implante se halla en la solución de sal neutra o luego, una vez extraído de la solución, cuando solo está cubierto por una capa delgada de la misma.

Aún fue más sorprendente que el efecto estabilizador de la capa deshidratada no fuera suprimido por irradiación gamma u otra radiación ionizante.

Los inventores han comprobado fácilmente por microscopía electrónica de barrido y análisis EDX la formación de dicha capa deshidratada (ver fig. 4). También se ha demostrado que esta capa deshidratada se forma generalmente

cuando la solución empleada no contiene componentes volátiles. Por ejemplo, una capa de este tipo no se forma cuando se evaporan soluciones metanólicas, etanólicas o acetónicas en presencia de superficies ultrahidrófilas. Aún no está claro el mecanismo exacto de estabilización de la capa ultrahidrófila mediante la capa deshidratada, pero podría depender de interacciones electrostáticas entre los electrolitos de la solución tampón y los grupos cargados de la superficie metálica. Una vez fuera de la solución tampón, para el proceso de evaporación solo queda una capa líquida muy delgada, de 0,1-0,2  $\mu\text{l}/\text{mm}^2$ , sobre la superficie metálica y el contenido de sustancias no volátiles en la capa deshidratada es muy bajo; por tanto no hace falta eliminarlas del implante antes de su incorporación. Como se ha dicho arriba, la diferencia entre superficie "hidrófila" y "ultrahidrófila" es que la primera se puede estabilizar con metanol, etanol y acetona. En cambio no se puede estabilizar de modo duradero con una solución de NaCl 0,15 M, sino solo con una concentración mucho mayor, de 0,5 M o más. Además la naturaleza "hidrófila" de las superficies se caracteriza por ángulos de contacto de 20-50°, mientras que las superficies "ultrahidrófilas" presentan ángulos de contacto de 0-10°. De ahí se deduce que las superficies conocidas hasta ahora como "hidrófilas" deben distinguirse de las "ultrahidrófilas". Según la presente invención las superficies ultrahidrófilas se pueden estabilizar mediante una capa deshidratada, lo cual hace pensar necesariamente que las superficies hidrófilas también podrían estabilizarse según el método de la presente invención, mediante este tipo de capa hidrófila formada por desecación de disoluciones con componentes no volátiles.

Según este método de preparación de un implante almacenable, dotado de una superficie ultrahidrófila, se introduce el implante en una solución salina que es inerte respecto a la superficie ultrahidrófila y rodea el implante por todos los lados. Para ello también puede usarse un implante preparado de otra manera, que posea características hidrófilas análogas, con la histéresis de ángulo de contacto arriba indicada, inferior a 10°, preferiblemente inferior a 5°, al mojarlo con agua. Como se ha dicho anteriormente la solución salina puede ser una disolución acuosa de una sola sal o de una combinación de varias sales, escogidas del grupo que lleva un anión  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{CNS}^-$ ,  $\text{ClCH}_2\text{COO}^-$ ,  $\text{F}_3\text{CCOO}^-$ ,  $\text{Cl}_2\text{CHCOO}^-$ ,  $\text{Cl}_3\text{CCOO}^-$ ,  $\text{Br}_3\text{CCOO}^-$  o un catión  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ , así como  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+$ ,  $(\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{N}^+$ ,  $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+$ .

Un desarrollo del método de la presente invención comprende luego la etapa adicional, consistente en embalar el implante para el transporte en la solución salina que tiene una concentración iónica total superior a 0,5 Mol/l, preferiblemente superior a 1 Mol/l, y cerrar el embalaje herméticamente a gases y líquidos.

De esta manera, según la presente invención, también se dispone de un embalaje húmedo que protege de forma segura el implante dotado de superficie ultrahidrófila contra la pérdida del carácter ultrahidrófilo.

Aunque este almacenamiento a largo plazo ya sea factible, a fin de facilitar el manejo es preferible que el implante en solución salina, sin embalarlo directamente, se someta a un proceso para evaporar a sequedad la solución salina a temperatura suave, sin menoscabar las propiedades del implante. En este caso basta que la solución salina tenga una concentración más baja que para el embalaje húmedo, pues en el curso de la evaporación aumenta la concentración y al formarse la capa deshidratada se supera el límite de solubilidad de la sal.

Preferentemente la cantidad de solución salina empleada y su concentración de sales debe ajustarse para que tras la evaporación quede una capa de sal con un espesor preferido de 1 hasta 500  $\mu\text{m}$  cubriendo al menos la superficie ultrahidrófila del implante. Con especial preferencia la solución salina deja tras la evaporación una capa de sal que rodea el implante por todos los lados.

Por lo tanto el implante así obtenido presenta la capa deshidratada mencionada por los inventores, que cubre y protege su superficie ultrahidrófila. El implante dotado de esta capa deshidratada se puede introducir en un embalaje seco y almacenar a largo plazo. Antes del almacenamiento se realiza en general una esterilización del implante que comprende preferiblemente el uso de radiación electromagnética.

Por consiguiente la presente invención también se refiere a un implante almacenable de este tipo, que puede obtenerse mediante las diversas formas de ejecución del método de la presente invención.

La presente invención también se explica con mayor detalle mediante las figuras adjuntas, que representan:

- fig. 1: un diagrama del tamaño de los ángulos de avance y retroceso en función del tiempo de tratamiento de una superficie metálica con ácido cromosulfúrico;
- fig. 2: imágenes de microscopía electrónica de una superficie ultrahidrófila nanoestructurada sobre titanio comercialmente puro, obtenida por el proceso de ácido cromosulfúrico, en distintas ampliaciones;
- fig. 3: un diagrama de liberación de DMP desde superficies metálicas distintamente tratadas;
- fig. 4: fotografías de microscopía electrónica de barrido de plaquitas de titanio SLA tratadas con ácido cromosulfúrico (14 x 14 x 1,5 mm) tras esterilización con radiación gamma en tampón de deshidratación (60 min. de ácido cromosulfúrico con  $\text{HNO}_3$  y enfriamiento brusco, esterilización gamma en PBS,  $\theta = 0^\circ$ ); y
- fig. 5: análisis EDX de una plaquita ultrahidrófila con capa deshidratada después de esterilizar con radiación gamma (A) y después de eliminar la capa deshidratada con agua (B).

Tal como muestra la **fig. 1** el tratamiento de la superficie metálica con ácido cromosulfúrico para preparar superficies

metálicas ultrahidrófilas produce resultados sorprendentes. Para ello se incubaron plaquitas de titanio a 240°C en ácido cromosulfúrico concentrado. Se verifica sorprendentemente la obtención de superficies ultrahidrófilas (ángulo de contacto:  $< 10^\circ$ ; histéresis del ángulo de contacto:  $- 0^\circ$ ; se indican las desviaciones estándar ( $n = 5$ )) en un intervalo de tiempo de 30-60 minutos.

5 Los inventores han encontrado curvas similares de mínimos con acero 316L, aleaciones de titanio y aleaciones de cobalto-cromo. En la **tabla 1** se indica que sobre la superficie ultrahidrófila se puede fijar (adsorber) cuatro hasta cinco veces más BMP-2 que sobre el control. La cantidad de BMP-2 fijada sobre la superficie de titanio no tratada es aún menor que en la superficie tratada con  $\text{HNO}_3$ .

10 Estas superficies ultrahidrófilas poseen una energía superficial muy grande, que en la zona ultrahidrófila (ángulo de contacto:  $< 11^\circ$ ; histéresis del ángulo de contacto:  $- 0^\circ$ ) corresponde a una tensión superficial  $\gamma_c = 71-72 \text{ dyn/cm}$ . La elevada tensión superficial produce la adsorción de proteínas adecuadas.

15 Durante la formación de la superficie ultrahidrófila el nuevo tratamiento con ácido cromosulfúrico produce una nueva nanoestructura (**fig. 2**). Sobre la superficie lisa de titanio previa al tratamiento se forman microestructuras globulares interrelacionadas, de 50-100 nm de diámetro, entre las cuales hay poros 50-100 nm de diámetro. Se supone que estas nanoestructuras están involucradas en la ultrahidrofilia. Las condiciones correspondientes a las imágenes A, B y C son:

20 A. Superficie industrial estándar SLA limpiada (chorreada con arena gruesa y tratada con ácido) a 25.000 aumentos  
La superficie se chorreó con corindón y luego se introdujo en un baño de ácido ( $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$ ). La superficie presenta una microestructura lisa, sin apariencia de nanoestructura.

25 B. Superficie SLA después del tratamiento en ácido cromosulfúrico a 240°C durante 60 minutos, a 25.000 aumentos  
El ácido cromosulfúrico produce funcionalmente una superficie ultrahidrófila y estructuralmente una nanoestructura "globular" junto a la microestructura SLA. El diámetro de las nanoesferas interrelacionadas es aproximadamente de 50-100 nm y el tamaño de los poros resultantes es del mismo orden.

30 C. Imagen de la nanoestructura globular a 150.000 aumentos sobre una superficie de titanio electropulida  
Las nanoesferas poseen un diámetro de aproximadamente 50 nm y están unidas entre sí. Entre ellas se forman poros de 10-100 nm de diámetro.

35 En otra etapa, sobre estas nanoestructuras se pueden inmovilizar péptidos tales como factores de crecimiento óseo mediante fijación por adsorción física o química, probablemente debido a interacciones hidrófilas sobre el material del implante. De este modo puede formarse sobre el implante una superficie de acción quimiotáctica y/o biológica, llamada yuxtacrina, que sirve para la colonización, proliferación y diferenciación de células óseas. Esto permite la elaboración de implantes denominados activos, que en el caso de las moléculas liberadas por la superficie tienen un efecto quimiotáctico, incluso a distancias de 500 hasta 1000  $\mu\text{m}$ , sobre las células, osteoblastos cuando son BMPs.

40 Para obtener la carga necesaria sobre la superficie metálica oxidada, los péptidos se introducen en una disolución tampón fisiológica a una concentración suficiente para dejar más de 200  $\text{ng/cm}^2$ , preferiblemente más de 500  $\text{ng/cm}^2$  y sobre todo más de 1000  $\text{ng/cm}^2$  del péptido sobre la superficie de óxido del implante metálico.

Esta carga se consigue generalmente con una disolución tampón fisiológica de péptidos a una concentración de más de 1  $\mu\text{g/ml}$ , preferiblemente mayor de 200  $\mu\text{g/ml}$  de disolución tampón.

45 Según la presente invención los péptidos son biomoléculas ventajosas para la biocompatibilidad del implante, en el sentido de contrarrestar un posible rechazo del implante y/o de favorecer su incorporación.

50 Ya se ha dicho anteriormente que como péptidos pueden usarse preferentemente proteínas de la clase TGF, sobre todo proteínas promotoras del crecimiento óseo, de la clase de los factores de crecimiento óseo "proteínas morfogénicas óseas", o de la clase de los factores de crecimiento vascular, como VEGF o angiostropina o también ubiquitina. La designación "factor de crecimiento transformante" (TGF) comprende concretamente el grupo (subgrupo) (i) de los "factores de crecimiento transformante beta" ( $\text{TGF-}\beta$ ) y el grupo (subgrupo) (ii) de las proteínas morfogénicas óseas (BMP). Estas últimas son proteínas osteoinductores que estimulan la neoformación y reparación ósea mediante la proliferación y diferenciación de células precursoras en osteoblastos. Además promueven la formación de fosfatasa alcalina, receptores hormonales, sustancias específicas del hueso como el colágeno de tipo 1, osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea (BSP) y finalmente la mineralización.

60 Para la inmovilización se puede usar una proteína de esta clase, sola o en combinación con otros miembros de la misma clase, o también junto con biomoléculas tales como proteínas de otras clases u hormonas de peso molecular bajo o incluso antibióticos, a fin de mejorar la defensa inmunológica. Estas otras moléculas también pueden inmovilizarse sobre la superficie mediante enlaces disociables en el medio fisiológico.

65 Los inventores ya habían visto con anterioridad que la cantidad de grupos óxido puede incrementarse sorprendentemente tratando la superficie del metal con ácido cromosulfúrico caliente y preferiblemente exento de posos. Bajo estas condiciones, en vez de disolverse el metal, como cabía esperar, al usar este ácido se forma sobre la superficie del metal una capa de óxido hidrófila, básicamente uniforme, de 5-50 nm de espesor. El método es tan suave que

incluso se pueden revestir dispositivos endoluminales coronarios, los llamados stents (que p.ej. pueden ser de acero inoxidable o de titanio), sin destruir la delgada y sensible retícula (de 50-150  $\mu\text{m}$  de diámetro). Como materiales para el tratamiento con óxido son especialmente adecuadas las superficies de metales de transición limpiadas con ácido diluido, p.ej. titanio, acero, aleaciones de acero como las de Cr-Mo, o las superficies de acero inoxidable o de titanio puro o de aleaciones de titanio purificadas con ácido cromosulfúrico.

Tanto en los implantes pulidos como en los chorreados con arena (superficies SLA) o en los tratados con plasmas metálicos (p.ej. proyección con plasma de titanio, TPS) la capa de óxido ultrahidrófila resultante de tratar la superficie metálica en condiciones definidas puede tener un espesor de 10 nm hasta 300 nm y una nanoestructura como la mostrada en la fig. 2, con distintas formas geométricas (por ejemplo redonda o poligonal). El metal empleado para el implante puede ser titanio puro o aleaciones de titanio (p.ej. TiAlV4, TiAlFe2,5), aluminio o acero inoxidable (p.ej. V2A, V4A, cromo-níquel 316L, acero Cr-Mo). Para obtener una capa delgada y lisa de óxido metálico se usa preferentemente un ácido cromosulfúrico comercial con 92% en peso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1,3% en peso de  $\text{CrO}_3$  y una densidad de 1,8  $\text{g/cm}^3$ , como por ejemplo el que vende la firma Merck.

En contraste con métodos anteriores, el nuevo método permite preparar en cualquier caso superficies ultrahidrófilas. Las tres etapas preferidas del proceso: (i) el nuevo tratamiento con ácido cromosulfúrico (choque térmico), (ii) el enfriamiento brusco en ácido sulfúrico conc. y (iii) el nuevo método de lavado con EDTA reducen el contenido de cromo (método EDX) sobre la superficie por debajo del límite de detección. El límite de detección por EDX está en 0,2-0,5% de átomos. Las nuevas superficies ultrahidrófilas exentas de cromo presentan las nuevas características especiales indicadas más adelante en cuanto a la fijación de BMP-2 y a la estabilización por la capa salina.

Cuando hay que aplicar una capa de óxido metálico más gruesa ( $> 1000$  nm) a la superficie del metal y/o preferiblemente una capa de óxido con micro y nanoporos, el ácido cromosulfúrico arriba descrito se diluye con agua hasta una densidad de 1,5 hasta 1,6  $\text{g/cm}^3$ . Después, al tratar la superficie del implante metálico tal como se ha descrito arriba, usando el ácido así diluido, se forma una capa superficial "rugosa" con cavidades y poros, con lo cual se amplía la superficie disponible para la carga de péptidos. Por tanto, ajustando distintas densidades del ácido cromosulfúrico y distintos tiempos y temperaturas de tratamiento, es posible aplicar gran variedad de capas de óxido muy adherentes, de diferentes propiedades, sobre las superficies metálicas.

La superficie ultrahidrófila generada por el ácido cromosulfúrico puede perder las propiedades hidrófilas cuando se almacena durante mucho tiempo al aire y en agua pura. En estas condiciones el ángulo de contacto puede subir a valores de 20-40° al cabo de 1-2 horas. Según la presente invención la superficie ultrahidrófila puede estabilizarse con una solución salina como agente estabilizador. Como se ha mencionado arriba, es preferible una estabilización mediante varias soluciones salinas que pueden ordenarse por su efecto en la precipitación de proteínas (tabla 2). Se trata, por ejemplo, de los aniones  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{CNS}^-$ ,  $\text{ClCH}_2\text{COO}^-$ ,  $\text{F}_3\text{CCOO}^-$ ,  $\text{Cl}_2\text{CHCOO}^-$ ,  $\text{Cl}_3\text{CCOO}^-$ ,  $\text{Br}_3\text{CCOO}^-$  o de los cationes  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ , y también cationes de tetraalquilamonio como  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{N}^+$ ,  $(\text{C}_3\text{H}_7)_4\text{N}^+$ ,  $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{N}^+$ . Se prefieren las disoluciones salinas de NaCl superiores a 0,15 mol/l, con especial preferencia por encima de 0,5 mol/l, sobre todo alrededor de 1 mol/l. En estas soluciones las superficies ultrahidrófilas son casi ilimitadamente estables. Estas altas concentraciones de sal se forman brevemente durante la evaporación, incluso a partir de mezclas tampón diluidas, como se ha dicho arriba. En la disolución tampón se prefiere una concentración salina de NaCl 135 hasta 140 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 hasta 8,2 mM, KCl 2,6 hasta 2,8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 hasta 1,6 mM, a un pH comprendido entre 7,3 y 7,5. Hasta llegar a sequedad la evaporación produce grandes concentraciones locales de sales. Ahí el  $\text{HPO}_4^-$ , cuyo efecto precipitante es mucho más fuerte que el del  $\text{Cl}^-$ , puede ejercer una influencia especialmente estabilizadora sobre la capa de óxido.

Por consiguiente la presente invención se refiere a un método para estabilizar de manera duradera mediante dichos "estabilizadores" los implantes dotados de una capa de óxido con nanoestructuras.

Los implantes recubiertos según la presente invención son estables al almacenamiento durante largo tiempo y, tras eliminar por lavado el recubrimiento de sales o sustancias orgánicas, se pueden cargar con los péptidos que actúan de mediadores.

Este proceso consiste en cargar la superficie de un implante con péptidos que se depositan e inmovilizan sobre la superficie del mismo, debido a las interacciones de adsorción física y química entre los péptidos y la superficie ultrahidrófila del implante.

Los péptidos se emplean en disolución tampón fisiológica, a una concentración suficiente para obtener una carga del péptido superior a 200  $\text{ng/cm}^2$ , preferiblemente superior a 500  $\text{ng/cm}^2$  y sobre todo superior a 1000  $\text{ng/cm}^2$  de superficie de óxido del implante metálico.

En general los péptidos se emplean en una solución tampón fisiológica a una concentración superior a 1  $\mu\text{g/ml}$ , preferiblemente superior a 200  $\mu\text{g/ml}$  de solución tampón. Conforme al método, como péptidos se utilizan factores de crecimiento de la clase de las proteínas TGF, sobre todo proteínas BMP, preferiblemente BMP-2 o BMP-7, factores de crecimiento vascular, como VEGF o angiotropina, ubiquitina, antibióticos o mezclas de ellos.

Si en las condiciones de acoplamiento los mediadores empleados son difícilmente solubles en el medio, se puede aumentar la solubilidad agregando tensioactivos/detergentes y luego llevar a cabo la reacción. A valores de pH > 6 los factores de crecimiento óseo y otros mediadores pueden mantenerse en solución, sin pérdida de actividad biológica, por medio de detergentes iónicos o no iónicos en un intervalo de concentración del 0,05-10%, preferiblemente del 1-5% en peso, sobre todo con 0,066% de SDS a valores de pH > 6, preferiblemente a pH 8-12, sobre todo a pH 9-11 y en especial a pH 10,0 para procesos de fijación en medio alcalino. Por tanto, en este método de elaboración de implantes recubiertos de péptidos, el implante con la superficie ultrahidrófila se trata con una disolución tampón, preferiblemente alcalina, que lleva uno o más detergentes. Este método puede incluir especialmente un tratamiento con un tampón NBS formado por tampón de borato sódico 125 mM y 0,066% de dodecilsulfato sódico (pH 10,0).

Por consiguiente este es un método para cargar implantes con factores de crecimiento óseo, sobre todo BMP-2, en el cual la superficie ultrahidrófila del implante se trata con una disolución del factor de crecimiento óseo a un pH de 9 hasta 11, preferiblemente 10. Para ello, por ejemplo, se puede tomar un implante que aún esté cubierto con la capa deshidratada, por ejemplo del embalaje seco, y tratarlo, preferiblemente de forma directa, con una solución del factor de crecimiento tamponada a pH 9 hasta 11, preferiblemente 10, sin tener que eliminar primero por lavado la capa deshidratada.

Así pues, la superficie ultrahidrófila de un implante - constituido opcionalmente por materiales metálicos como titanio puro, aleaciones metálicas de titanio, aleaciones de cromo/níquel/aluminio/vanadio/cobalto (p.ej. TiAlV4, TiAlFe2,5), aceros inoxidable (p.ej. V2A, V4A, cromo-níquel 316L), materiales cerámicos, sobre todo hidroxiapatito, óxido de aluminio, o combinaciones de los materiales metálicos con materiales cerámicos en las que el material metálico está compuesto con el material cerámico - se puede recubrir con factores de crecimiento óseo, sobre todo con BMP-2, mediante una solución tamponada en la zona ácida, a pH entre 4 y 5, sobre todo a pH 4,5, o en la zona débilmente alcalina, a pH entre 9 y 11, sobre todo a pH 10. El recubrimiento en medio alcalino puede realizarse ventajosamente en presencia de detergentes como SDS.

Otra forma de ejecución especialmente preferida de este método consiste en aplicar sobre la superficie ultrahidrófila del implante una solución tampón fisiológica de BMP-2 o BMP-7 a una concentración superior a 1 µg de BMP-2 o BMP-7/ml de solución tampón, preferiblemente superior a 200 µg de BMP-2 o BMP-7/ml de solución tampón. Dichas concentraciones bastan en general para lograr una carga superior a 200 ng de BMP-2 o BMP-7/cm<sup>2</sup>, preferiblemente superior a 500 ng de BMP-2 o BMP-7/cm<sup>2</sup> y, con especial preferencia, superior a 1000 ng de BMP-2 o BMP-7/cm<sup>2</sup>, sobre la superficie oxidada del implante metálico.

Los implantes con una superficie ultrahidrófila elaborados según este método están formados por material de titanio, aleaciones de titanio, aluminio, acero inoxidable, aleaciones de acero, aleaciones cromadas, materiales cerámicos como hidroxiapatito o combinaciones de los mismos. El implante puede ser una prótesis articular u ósea, un implante dental o, particularmente, un dispositivo endoluminal coronario (un llamado stent coronario, de unos 10 mm de largo) recubierto con un péptido, p.ej. BMP-2, para evitar o paliar terapéuticamente una complicación tardía por reestenosis debida a la proliferación de células de músculo vascular liso y promover por tanto la integración y la compatibilidad.

La influencia sobre las células óseas de los materiales modificados según el método se estudió en experimentos con animales. A tal fin los materiales modificados se prepararon en forma de plaquitas o halteras. Al cabo de 4 semanas tras la implantación en los animales se observó una formación ósea acelerada en contacto con la superficie del implante, por efecto del BMP-2 sobre los materiales, lo cual se explica más detalladamente mediante los siguientes ejemplos.

#### Modificación de metales (titanio, acero inoxidable 316 L):

En los ejemplos descritos a continuación se emplearon plaquitas de titanio pulidas mecánicamente/electropulidas, oxidadas anódicamente, plaquitas de aleación de titanio pretratadas con otros ácidos, chorreadas con arena o recubiertas con plasma de aleación porosa de titanio, con o sin tratamiento de ácido cromosulfúrico. Análogamente se usan aceros inoxidables pulidos mecánicamente/electropulidos, con o sin tratamiento de ácido cromosulfúrico.

#### Métodos de limpieza

Antes de cada uso los metales se limpiaron calentándolos durante 2 horas a 80°C en HNO<sub>3</sub>. Después de lavarlas con agua las plaquitas se secaron por lavado en 30 ml de metanol seco. Luego se utilizaron directamente o se trataron con ácido cromosulfúrico.

#### Tratamiento con ácido cromosulfúrico

Las plaquitas de titanio se calentaron por choque térmico a 210-240°C en ácido cromosulfúrico (92% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,3% de CrO<sub>3</sub>), se incubaron durante 30-90 minutos a esta temperatura y luego se enfriaron bruscamente con ácido sulfúrico concentrado hasta la temperatura ambiente. Después las muestras metálicas se lavaron con 10 x 50 ml de agua, 2 x 30 min. en EDTA al 10% ((pH 7) ultrasonidos) y a continuación 1-3 x 30 min. en EDTA al 10% hirviendo (pH 7) y luego se lavaron durante 30 minutos con agua hirviendo y se enjuagaron con agua. De esta forma se puede

preparar una superficie ultrahidrófila fundamentalmente libre de cromo, es decir, no se pueden detectar iones cromo libres sobre la superficie.

Ejemplo 1 – inmovilización de rhBMP-2 sobre plaquitas de titanio ultrahidrófilas

5 Las plaquitas de titanio pretratadas se lavaron y se equilibraron con tampón de borato sódico 125 mM y 0,066% de dodecilsulfato sódico, pH 10,0. El BMP-2, inicialmente en tampón Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 1000 mM, EDTA 5 mM, 3-[(3-colamido-propil)dimetilamonio]-propansulfonato 33 mM (= tampón CPDP), se dializó contra el tampón de borato sódico 125 mM, 0,066% de dodecilsulfato sódico, pH 10,0 (= tampón NBS) y se incubó durante 12-14 horas a una  
10 concentración de 0,2-0,3 mg/ml y a la temperatura ambiente, en agitación, con las plaquitas de titanio. Después se lavaron 4 x con tampón de borato y seguidamente con agua.

Tabla 1 - Inmovilización de rhBMP-2 sobre plaquitas de titanio (5 x 10 x 1 mm) tratadas con HNO<sub>3</sub> o con ácido cromosulfúrico

Modificación de titanio electropulido	125I-rhBMP-2 inmovilizado [ng/cm <sup>2</sup> ]
tratado con HNO <sub>3</sub> ( $\theta_a/\theta_r = 40^\circ/20^\circ$ )	273 ± 107 (4)
ultrahidrófilo ( $\theta_a/\theta_r = 1^\circ/1^\circ$ )	1272 ± 636 (4)
Tampón de inmovilización: borato 125 mM/0,066% de SDS, pH 10,0, C <sub>rhBMP-2</sub> = 0,25 mg/ml, n = 4 $\theta_a$ : ángulo de avance dinámico, $\theta_r$ : ángulo de retroceso dinámico	

Tabla 2 – Secuencia de sales según su efecto reductor o aumentativo de la solubilidad de las proteínas

Efecto reductor	Efecto aumentativo
Aniónico: SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> > HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> > CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> > Cl <sup>-</sup> > Br <sup>-</sup> > NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> > ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> > I <sup>-</sup> > CNS <sup>-</sup> > CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> > ClCH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> > F <sub>3</sub> CCOO <sup>-</sup> > Cl <sub>2</sub> CHCOO <sup>-</sup> > Cl <sub>3</sub> CCOO <sup>-</sup> > Br <sub>3</sub> CCOO <sup>-</sup>	
Catiónico: (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup> > NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> > Rb <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Cs <sup>+</sup> > Li <sup>+</sup> > Mg <sup>2+</sup> > Ca <sup>2+</sup> > Ba <sup>2+</sup>	
Catiónico/hidrófobo (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup> > (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup> >> (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup> , (C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	

El efecto de las sales tiene lugar, entre otras cosas, a través de la estructura acuosa. Las sales estabilizan o desestabilizan la superficie ultrahidrófila a través de las moléculas de agua y de los grupos iónicos unidos a la superficie de titanio. Se prefieren las soluciones salinas de NaCl superiores a 0,15 mol/l, con especial preferencia superiores a 0,5 mol/l, sobre todo del orden de 1 mol/l.

Ejemplo 2 – liberación de rhBMP-2 de las plaquitas de titanio ultrahidrófilas

25 Como muestra la **fig. 3**, la adsorción de rhBMP-2 a una superficie de titanio ultrahidrófila y la liberación desde esta superficie es claramente mejor, si se compara con la superficie de titanio tratada solamente con HNO<sub>3</sub> diluido para la limpieza, lo cual se aprecia mediante la cinética de liberación de rhBMP-2 por una superficie de titanio ultrahidrófila, en el gráfico de la **fig. 3**. También son claras las grandes diferencias de capacidad. Las curvas de liberación representadas pueden ajustarse con una función exponencial de 3 fases. En el caso del control son solo 2 fases. La liberación está medida a lo largo de 62 días. En la **tabla 3** se indican los tiempos de liberación media y las cantidades de rhBMP-2 liberadas.

Tabla 3 - Liberación de rhBMP-2 de las plaquitas de titanio ultrahidrófilas

Fase de liberación	Tratadas con HNO <sub>3</sub> ( $\theta_a/\theta_r = 40^\circ/20^\circ$ ) $\Gamma_0 = 181 \text{ ng/cm}^2$		Superficie de titanio ultrahidrófila ( $\theta_a/\theta_r = 1^\circ/1^\circ$ ) $\Gamma_0 = 1551 \text{ ng/cm}^2$	
	T1/2 días	Cantidad liberada/día ng/día	T1/2 días	Cantidad liberada/día ng/día
1ª Fase (2 días)	0,28	36	0,37	193
2ª Fase (42 días)	39	0,5	33	14
3ª Fase (18 días)	39	0,5	231	7
Cantidad total liberada en 62 días:		102		1100
$\Gamma_0$ : cantidad de rhBMP-2 inmovilizado/cm <sup>2</sup> en el momento t = 0.				

35 Como puede verse en la figura 4 las fotografías de microscopía electrónica de barrido de las plaquitas de titanio SLA (14 x 14 x 1,5 mm) tratadas con ácido cromosulfúrico, tras la esterilización por radiación gamma en tampón de deshidratación (60 min. de ácido cromosulfúrico con HNO<sub>3</sub> y enfriamiento brusco, esterilización gamma en PBS,  $\theta = 0^\circ$ ), muestran una superficie de óxido de titanio con microcavernas, ultrahidrófila y esterilizada, recubierta por una capa protectora de tampón de deshidratación desecado que, una vez eliminada por lavado, queda como una superficie de  
40 óxido de titanio ultrahidrófila pura, tal como demuestran los análisis EDX representados en la fig. 5 de una plaquita ultrahidrófila con capa deshidratada tras la esterilización gamma (A) y después de eliminar la capa deshidratada con agua (B).

5 En la tabla 4 se indica la estabilidad al almacenamiento de las superficies ultrahidrófilas, expresada como la dependencia del ángulo de contacto dinámico de plaquitas de titanio SLA ultrahidrófilas (14 x 14 x 1,5 mm), esterilizadas con radiación gamma y dotadas de una capa deshidratada según la presente invención, en función del tiempo de almacenamiento, entendiéndose como plaquitas de titanio SLA aquellas cuya superficie está chorreada con arena y tratada con ácido. Se aprecia que una superficie hidrófila "desprotegida" ya es menos hidrófila al cabo de algunas horas de exposición al aire, mientras que los ángulos de contacto de las plaquitas de titanio SLA ultrahidrófilas, esterilizadas con radiación gamma y provistas de la capa deshidratada según la presente invención, permanecen casi constantes a 0° tras 24 semanas de almacenamiento.

10

Tabla 4

Muestra	Muestra antes del tratamiento con ácido cromosulfúrico		Tiempo de almacenamiento después del tratamiento con ácido cromosulfúrico (con capa deshidratada y esterilización gamma)														
	18 h al aire		Control (0 días)		6 días		15 días		4 semanas		8 semanas		18 semanas		24 semanas		
	$\theta_a$	$\theta_r$	$\theta_a$	$\theta_r$	$\theta_a$	$\theta_r$	$\theta_a$	$\theta_r$	$\theta_a$	$\theta_r$	$\theta_a$	$\theta_r$	$\theta_a$	$\theta_r$	$\theta_a$	$\theta_r$	
SLA-1	59,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SLA-2	53,3	0,0	0,0	0,0	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SLA-3	100,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SLA-4	94,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SLA-5	86,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Valor medio ( $\emptyset$ )	78,8	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Desviación estándar (s)	21,3	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para elaborar un implante almacenable con una superficie ultrahidrófila, que consiste en introducir el implante dotado de una superficie ultrahidrófila, cuyo ángulo de contacto dinámico es de 0° hasta 10° al mojarla con agua, en una solución acuosa salina que es inerte frente a la superficie y que rodea el implante por todos los lados, y en evaporar la solución acuosa salina para que forme una capa deshidratada que estabiliza y protege la superficie del implante.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el cual la solución salina se emplea en tal cantidad y concentración que después de la evaporación queda una capa deshidratada de 1 hasta 500 µm de espesor recubriendo, al menos, la superficie ultrahidrófila del implante.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el cual se usa una solución acuosa salina que tras la evaporación deja una capa deshidratada que rodea el implante por todos los lados.
- 20 4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, que incluye la etapa adicional de esterilización del implante.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el cual la esterilización del implante incluye un tratamiento con radiación ionizante, especialmente con radiación electromagnética.
- 30 6. Implante almacenable que puede obtenerse por el método según una de las reivindicaciones 1 hasta 5.
- 35 7. Método para elaborar un implante almacenable con una superficie ultrahidrófila, que consiste en introducir el implante dotado de una superficie ultrahidrófila, cuyo ángulo de contacto dinámico es de 0° hasta 10° al mojarla con agua, en una solución acuosa salina que es inerte frente a la superficie ultrahidrófila, que rodea el implante por todos los lados y que tiene una concentración iónica total superior a 0,5 mol/l, y en embalar el implante para el transporte en la solución acuosa salina de forma hermética a gases y líquidos.
- 40 8. Método según la reivindicación 7, en el cual la solución acuosa salina tiene una concentración iónica total superior a 1 mol/l.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, que incluye la etapa adicional de esterilización del implante.
10. Método según la reivindicación 9, en el cual la esterilización del implante incluye un tratamiento con radiación ionizante, especialmente con radiación electromagnética.
11. Implante almacenable dentro de un embalaje de transporte que puede obtenerse por el método según una de las reivindicaciones 7 hasta 10.

Fig. 1

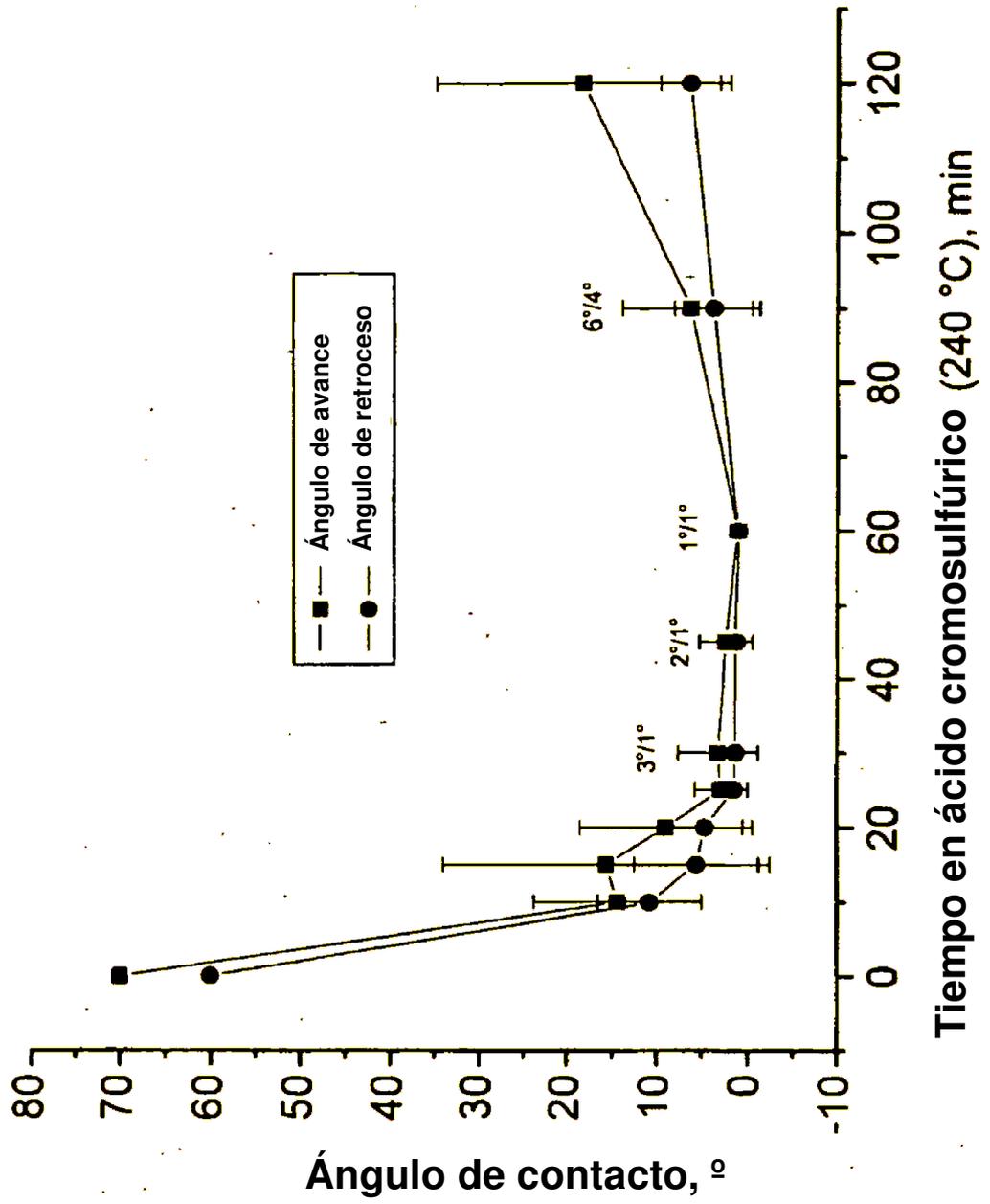


Fig. 2

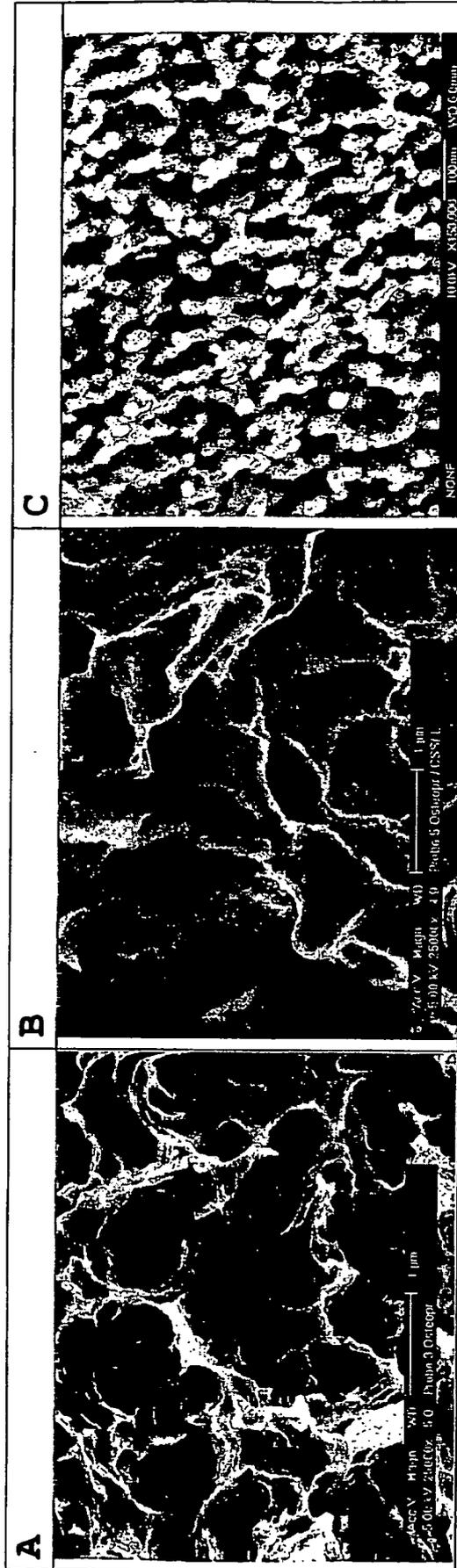


Fig. 3

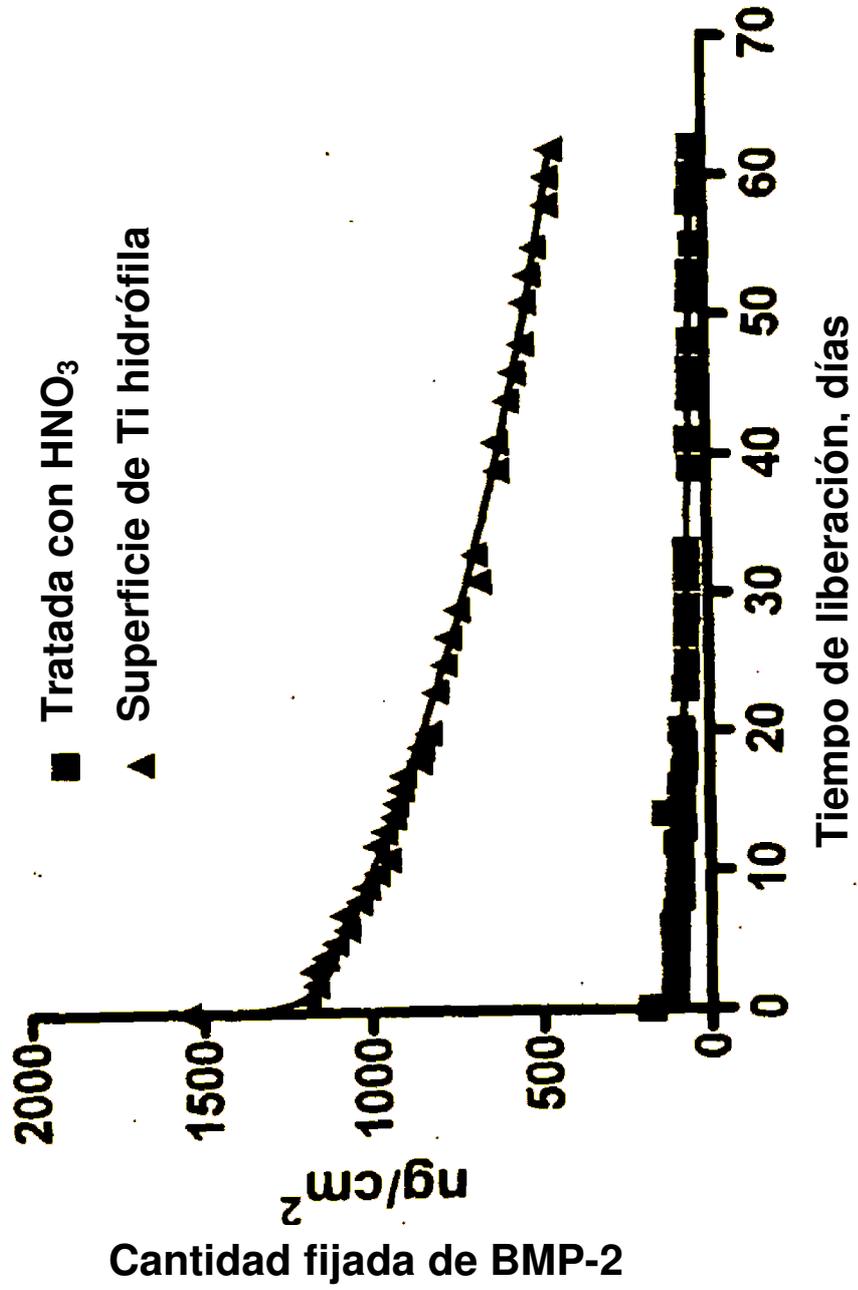


Fig. 4

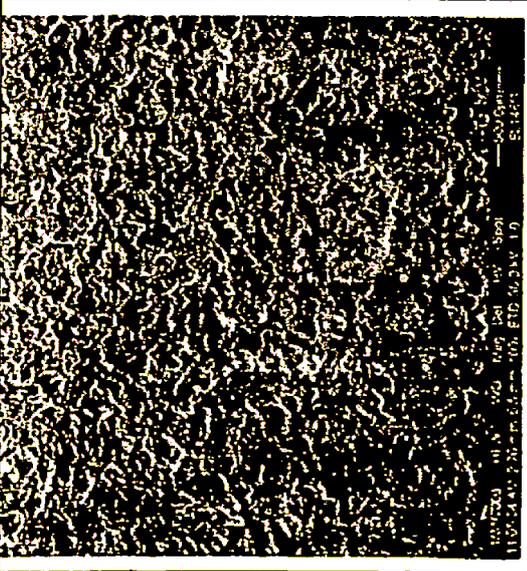
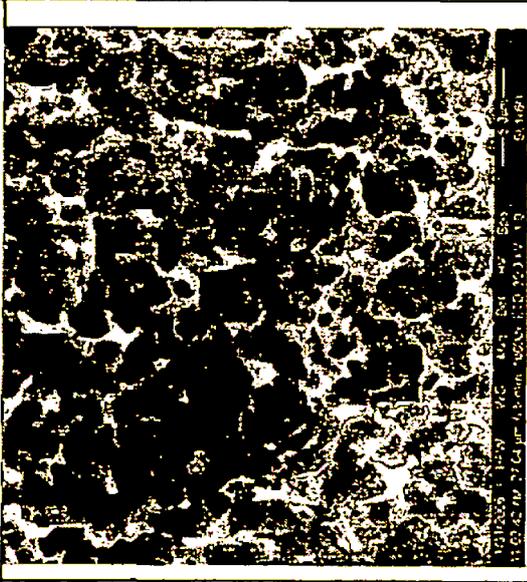
<b>A.</b>	 <p>11002441 2.0kV X100.0 ETD 6.3kV 110 11002441 2.0kV X100.0 ETD 6.3kV 110 11002441 2.0kV X100.0 ETD 6.3kV 110</p>	Aumento 1:100
<b>B.</b>	 <p>11002441 2.0kV X10000.0 ETD 6.3kV 110 11002441 2.0kV X10000.0 ETD 6.3kV 110 11002441 2.0kV X10000.0 ETD 6.3kV 110</p>	Aumento 1:10 000
<b>C.</b>	 <p>11002441 2.0kV X100000.0 ETD 6.3kV 110 11002441 2.0kV X100000.0 ETD 6.3kV 110 11002441 2.0kV X100000.0 ETD 6.3kV 110</p>	Aumento 1:100 000

Fig. 5

