

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 043**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/06** (2006.01)

**A61L 27/30** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2008** **E 08838557 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013** **EP 2214732**

54 Título: **Superficies multifuncionales de titanio para integración en hueso**

30 Prioridad:

**12.10.2007 IT TO20070719**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**28.10.2013**

73 Titular/es:

**POLITECNICO DI TORINO (100.0%)  
CORSO DUCA DEGLI ABRUZZI 24  
10129 TORINO, IT**

72 Inventor/es:

**SPRIANO, SILVIA;  
VERNE', ENRICA y  
FERRARIS, SARA**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 427 043 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**

Superficies multifuncionales de titanio para integración en hueso

5 La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de dispositivos protésicos que incluyen titanio o aleaciones de titanio, dispositivos generalmente implantables constituidos totalmente o en parte de titanio y/o sus aleaciones, a través de un tratamiento de modificación de superficie para producir una superficie bioactiva.

10 La mejora de la integración de implantes en hueso y la regeneración de tejido en el sitio dañado es todavía un problema abierto en cirugía ortopédica y dental. Por este motivo es interesante proporcionar implantes con superficies biomiméticas multifuncionales capaces de estimular la regeneración de tejido desde un punto de vista tanto inorgánico como biológico.

15 Dentro de este marco, la invención proporciona la modificación de superficies de titanio o sus aleaciones (utilizadas para prótesis ortopédicas, implantes dentales o implantes médicos fabricados generalmente con titanio o sus aleaciones) mediante un tratamiento termoquímico y opcionalmente funcionalización de la superficie con biomoléculas, a fin de conseguir *in vivo* un comportamiento bioactivo, tanto desde un punto de vista inorgánico como biológico.

20 El término bioactividad inorgánica indica la capacidad de la superficie para adsorber particularmente Ca y P desde fluidos fisiológicos y para inducir la precipitación de hidroxiapatita (mineral constituyente del hueso). Por otra parte bioactividad biológica significa la capacidad de la superficie para estimular respuestas biológicas (adhesión celular, proliferación y diferenciación) a fin de hacer más rápido el crecimiento de la fracción orgánica del hueso.

25 Una superficie capaz de estimular simultáneamente ambas actividades, con interacción sinérgica entre ellas, es un material multifuncional adecuado para la integración rápida y eficaz en el hueso de un implante permanente.

30 Este comportamiento en lo que respecta al titanio y sus aleaciones se debe a la composición química, la estructura cristalográfica, la morfología y la energía de superficie de la capa de óxido en la superficie que está presente sobre el metal.

En la literatura científica y en las patentes se han propuesto varios tratamientos con el fin de obtener bioactividad inorgánica de titanio y sus aleaciones.

35 El documento US 5.609.633 describe un material para implantes óseos que incluye un sustrato de titanio y una capa de superficie constituida de óxido de titanio y un titanato alcalino amorfo, que se obtiene remojando sustrato de titanio en una solución alcalina y tratando térmicamente a continuación el material a fin de formar una capa de titanato alcalino estabilizado.

40 El documento US 6.183.255 describe implantes dentales u ortopédicos, con funcionalidad biológica que se obtienen mediante un tratamiento químico en hidróxido de sodio o mediante un tratamiento ácido al que sigue un tratamiento alcalino y opcionalmente oxidación al aire.

45 También se reseña en la literatura que el uso de hidróxido de hidrógeno induce bioactividad, según se describe en Biomaterials, 23, 1353-1357 (2002), Biomaterials, 23, 3103-3111 (2002), Biomaterials, 22, 875 (2001) y Surface & Coating Technology, 195, 252-257 (2005).

50 El documento KR 20030038631 divulga un implante de titanio o de una aleación de titanio con una superficie bioactiva fabricada mediante un proceso que comprende un ataque ácido con una mezcla de ácido fluorhídrico y ácido nítrico y una oxidación de la superficie con una solución de peróxido de hidrógeno y cloruros metálicos.

55 El documento EP 0806211 A1 describe un tratamiento de la superficie en dos etapas para implantes de titanio con el uso de una solución de ácido fuerte, tal como los ácidos clorhídrico, sulfúrico, perclórico o una combinación de los mismos, al que siguen opcionalmente agentes oxidantes tales como ácido nítrico, perácidos, hidroperóxidos o peróxido de hidrógeno, a los que siguen opcionalmente etapas de neutralización.

60 El objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para modificar superficies de titanio o de aleaciones de titanio mediante tratamiento termoquímico a fin de obtener una superficie altamente hidroxilada. Este método es favorable porque no requiere tratamientos de larga duración en soluciones agresivas, no daña mecánicamente las superficies y no compromete la resistencia a la fatiga.

65 Un segundo objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para preparar una superficie particularmente adecuada para una etapa de tratamiento opcional posterior en el que la superficie se funcionaliza con biomoléculas.

Considerando los objetivos descritos, el objetivo de la presente invención es un proceso según se define por las

siguientes reivindicaciones.

En los dibujos que se adjuntan:

- 5 - la figura 1 es una micrografía de SEM que muestra la microrrugosidad superficial de una superficie de titanio después del ataque ácido (a) y después del ataque ácido y el tratamiento con peróxido de hidrógeno (b);
- la figura 2 es un espectro de XPS de la región de oxígeno, muestra la exposición de hidroxilos para el óxido nativo (a) y para la superficie modificada (b);
- 10 - la figura 3 es una micrografía de SEM que muestra la precipitación de hidroxiapatita sobre una superficie de material modificada según la invención después de 15 días de remojo en SBF;
- la figura 4 es un espectro de XRD después de 15 días de remojo en SBF;
- 15 - la figura 5 muestra espectros de XRD para muestras después de tratamiento químico y térmico;
- la figura 6 muestra resultados de análisis de XPS para muestras activadas por medio de cloruro de trifluoretanosulfonilo;
- 20 - la figura 7 muestra espectros de XPS para muestras funcionalizadas con fosfatasa alcalina (ALP): análisis panorámico (a), detalle de la región de carbono (b); y
- la figura 8 es un histograma que muestra la actividad enzimática para muestras funcionalizadas.

25

#### Bioactividad inorgánica

La primera etapa del tratamiento es un ataque ácido a fin de retirar el óxido nativo presente sobre la superficie de titanio (o aleación de titanio) y hacerla macrorrugosa. El ataque ácido se lleva a cabo usando ácido fluorhídrico diluido, por ejemplo, con una concentración de 3 M a 8 M, durante un tiempo comprendido entre 1 y 5 minutos. La figura 1a muestra la superficie macrorrugosa de titanio tratada con ácido fluorhídrico 5 M durante 3 minutos.

30

A este tratamiento le sigue una oxidación controlada, que se realiza con una solución de peróxido de hidrógeno con una concentración en el intervalo de 15-70 volúmenes, preferentemente a una temperatura entre 20 °C y 80 °C durante un tiempo en el intervalo de 30-400 minutos, mejor si está entre 30 y 225 minutos.

35

La Figura 1b muestra la microrrugosidad de la superficie después de oxidación con peróxido de hidrógeno de 40 volúmenes durante 225 minutos a 60 °C.

40 El proceso de oxidación se tiene que llevar a cabo de manera que se evite la re-pasivación de la superficie entre las dos pasadas (ataque ácido y oxidación controlada).

Se han optimizado los parámetros del proceso para evitar la formación de grietas en la superficie. La capa de óxido obtenida presenta un gran número de grupos hidroxilo (fig. 2b) y una morfología típica caracterizada por la rugosidad y la porosidad a escala submicrométrica (fig. 1b). Los grupos hidroxilo tienen una energía de enlace comprendida en el intervalo de 531,5 - 532,2 eV, que es intermedia entre los grupos ácido OH y los básicos, según se reseña en J. Biomed. Mater. Res. 55, 185-193 (2001).

45

El material así tratado es bioactivo desde el punto de vista inorgánico. De hecho, promueve la precipitación de hidroxiapatita tras 15 días de remojo en fluido corporal simulado (SBF). La micrografía de SEM (fig. 3) muestra la morfología típica de los precipitados, que son agregados de partículas esféricas pequeñas. El espectro de EDS destaca su composición química cualitativa. La proporción de Ca/P es de 1,7, por tanto muy cerca de la estequiométrica para la hidroxiapatita (1,67). La parte de superficie de la muestra que no está cubierta por partículas presenta un enriquecimiento en calcio y fósforo tras el remojo en SBF. Esto significa una capacidad general de la superficie para adsorber estos elementos. El análisis de XRD (fig. 4) confirma la presencia de hidroxiapatita sobre la superficie del material; está presente en una fase parcialmente amorfa con cristalitas de pequeñas dimensiones, como se puede deducir de la presencia de picos de difracción anchos.

50

55

Las muestras tratadas químicamente (primero con HF y luego con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se han tratado luego térmicamente a fin de estabilizar la capa de óxido. Se podría realizar el tratamiento térmico en un intervalo de temperatura entre 300 °C y 600 °C, en aire, a vacío o en atmósfera inerte, durante un tiempo comprendido entre 1 y 8 horas. La morfología y la bioactividad se mantienen tras el tratamiento térmico.

60

Los grupos hidroxilo son estables con la temperatura, de hecho se ha detectado su presencia tras almacenamiento prolongado y tratamiento térmico.

65

El grosor y la cristalinidad de la capa de óxido se pueden ajustar a las necesidades variando la temperatura y la atmósfera del tratamiento térmico (fig. 5). Se puede observar un incremento progresivo de los picos de reflexión de anatasa con el aumento de temperatura del tratamiento, según lo esperado.

- 5 Las pruebas de fatiga destacan una disminución baja en la resistencia a la tracción (2-15 %) tras el tratamiento; así, este proceso no altera significativamente las propiedades mecánicas del material.

10 Se han realizado pruebas biológicas sobre células humanas del tipo osteoblasto (MG63) a fin de evaluar la interacción entre material y células. No se ha observado diferencia en la producción de LDH entre el titanio natural, el titanio modificado y el control: esto es un indicador de que el tratamiento no induce efecto citotóxico significativo alguno.

15 Se ha observado que se adhieren células tanto sobre titanio natural como sobre el tratado con la típica morfología poligonal, pero se podría destacar que, sobre las superficies modificadas, las células aparecen más extendidas y presentan más ondulaciones dorsales y filopodios alargados más numerosos que sobre la referencia de Ti.

20 Los osteoblastos cultivados sobre la superficie de titanio modificada superficialmente muestran una buena tasa de proliferación y una producción de ALP, colágeno I y osteocalcina significativamente más alta que sobre las muestras de control. Esto significa que los osteoblastos cultivados sobre la superficie modificada tienen un grado de diferenciación más alto en comparación con los del titanio sin tratar y el control. Así, la simple modificación inorgánica influye en la respuesta biológica del material.

#### Bioactividad biológica

25 Preferentemente, el proceso considerado en la invención incluye (como etapa adicional) un tratamiento de funcionalización de la superficie de titanio o sus aleaciones con moléculas orgánicas (naturales o sintéticas) implicadas en la mineralización del hueso (tales como proteína de la matriz extracelular, péptidos o enzimas implicados en procesos de adhesión/proliferación, proteínas morfogenéticas del hueso, factores de crecimiento, albúmina, fibronectina, fosfatasa alcalina y similares). La funcionalización de la superficie es ventajosa porque  
30 permite el injerto de una cantidad controlada de las biomoléculas, evitando un excesivo uso, tal como el que resulta de la inyección local o suministro sistémico.

35 Se describen dispositivos protésico o implantes médicos con superficies de titanio funcionalizadas con biomoléculas en los documentos US 2007/077 346 y US 2004/083 006. En el documento US 2007/077 346 se recubren superficies de titanio con el correspondiente hidruro que contiene una o más biomoléculas; el proceso de biofuncionalización se lleva a cabo mediante un tratamiento electrolítico en presencia de las biomoléculas.

40 En el documento US 2004/083 006 se recubren superficies metálicas con una capa de hidróxido mediante un proceso de electrólisis en presencia de una o más biomoléculas.

45 En lo que concierne a la presente invención, las biomoléculas capaces de inducir una respuesta celular preferentemente se fijan de modo covalente en la superficie de titanio (o aleación de titanio) que se ha hecho previamente bioactiva desde el punto de vista inorgánico. Se ha elegido el enlace covalente directo como mecanismo de injerto porque es más selectivo y permite una mejor adhesión que la simple adsorción o liberación desde un vehículo reabsorbible.

50 El proceso de funcionalización seleccionado evita la silanización y el empleo de otras moléculas espaciadoras que podrían ser tóxicas (tal como el glutaraldehído). En particular para el proceso de funcionalización descrito, es fundamental la exposición de grupos hidroxilo en la superficie tratada porque representan el grupo funcional reactivo útil para el injerto de la biomolécula en la superficie.

55 En particular, para esta modificación de la superficie, se han llevado a cabo el ataque ácido y la oxidación controlada sobre la superficie de titanio según se describe en la sección anterior, posteriormente, se ha activado dicha superficie con un cloruro orgánico, particularmente con cloruro de trifluoretanosulfonilo (TC), como ya se ha reseñado en la literatura; véanse, por ejemplo, "Biochemical Surface Modification of CO-Cr-MO", D. A. Puleo, Biomaterials (17) (1996), 217-222 y "Direct Attachment of Fibronectine to Trisylchloride Activated Titanium", T. Hayakawa y cols., J. Biomed. Mater. Res. 67 (2003), 684-688.

60 En un ejemplo particular, la funcionalización biológica se ha llevado a cabo usando la enzima fosfatasa alcalina (ALP), que está implicada en los procesos de mineralización de tejidos duros; diversos trabajos de la literatura sugieren que su aplicación local promueve el crecimiento y la mineralización del hueso dañado. Además, la ALP es una buena molécula modelo porque es bastante sencilla de detectar. Sin embargo, la etapa de funcionalización biológica no se limita al ejemplo específico descrito aunque generalmente es imposible emplear proteínas de la matriz extracelular o enzimas implicadas en procesos de adhesión/proliferación, según se ha dicho anteriormente.

65 Preferentemente, la activación de la superficie con cloruro de trifluoretanosulfonilo se realiza a una temperatura de

reacción comprendida entre 20 °C y 50 °C durante tiempos de 10 minutos a 72 horas. Las condiciones preferentes son 37 °C durante 48 horas.

5 La presencia de un gran número de grupos hidroxilo sobre la superficie es crucial para la respuesta del material a esta segunda fase del tratamiento.

La presencia de cloruro de trifluoretanosulfonilo sobre la superficie del material se ha determinado por medio de análisis de XPS (fig. 6): el pico D (a aproximadamente 292 eV) es característico de los enlaces C-F.

10 La etapa final del proceso es el injerto enzimático en las superficies modificadas. Para este propósito, se ha de preparar una solución de la biomolécula elegida, diluyendo la molécula en PBS preferentemente, para alcanzar una concentración final comprendida entre 2 y 40 mg/ml, remojando las muestras durante un tiempo en el intervalo de 0,5 - 72 horas, a una temperatura entre 0 °C y 50 °C.

15 En una aplicación particular del proceso, se ha empleado una solución de ALP de 5 mg/ml en PBS con una incubación de 24 horas a 4 °C.

El resultado del proceso de modificación es un anclaje directo de la molécula a la superficie de titanio, porque el cloruro de trifluoretanosulfonilo es un buen grupo saliente.

20 La presencia de enzimas se ha determinado por medio de análisis de XPS que muestra un incremento en carbono y nitrógeno y una disminución en óxido de titanio (fig. 7) en la capa exterior de la superficie modificada. Esto es indicativo de un recubrimiento orgánico. El estudio detallado de la región de carbono destaca que la señal más alta es debida a los enlaces C-O y C-N, característicos de la enzima (fig. 7 - pico B, a 286 eV). El pico D (a 289 eV) se podría atribuir a los anillos aromáticos aplanados sobre la superficie. Ambas señales son significativamente diferentes de la contaminación orgánica siempre presente sobre las superficies de titanio.

25 La actividad enzimática después del anclaje sobre la superficie se ha determinado por medio de análisis de UV-visible, después de la reacción con paranitrofenilfosfato. Esta reacción produce paranitrofenol que tiene una coloración amarilla en medio alcalino. La intensidad del amarillo, evaluada espectrofotométricamente, se podría correlacionar con la cantidad de ALP presente en la superficie del material.

30 Los resultados (fig. 8) muestran que la enzima anclada a la superficie mantiene su actividad y que se requiere el proceso de funcionalización entero (hidroxilación, activación de superficie e injerto molecular) para obtener una funcionalización eficaz.

35

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la preparación de un dispositivo protésico o implante médico que comprende titanio o aleaciones de titanio, mediante un tratamiento de modificación de superficie, a fin de hacer bioactiva la superficie de titanio o aleación de titanio, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) un ataque ácido con una solución ácida que consiste en ácido fluorhídrico diluido para retirar de ese modo el óxido nativo presente en dicha superficie de dicho dispositivo protésico o implante médico; y
- 10 b) oxidación de la superficie con una solución de peróxido de hidrógeno, a fin de producir grupos hidroxilo sobre la superficie.
2. Un proceso según la reivindicación 1, en el que a la etapa b) le sigue la etapa: c) tratamiento térmico a fin de estabilizar la capa de óxido generada en la etapa b).
- 15 3. Un proceso según la reivindicación 2, en el que dicha etapa c) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 300 °C y 600 °C, durante tiempos de desde 1 hasta 8 horas en aire, a vacío o en atmósfera inerte.
- 20 4. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ataque ácido de la etapa a) se lleva a cabo en ácido fluorhídrico diluido, con una concentración molar entre 1 y 10, durante un tiempo en el intervalo de 0,5-30 minutos.
- 25 5. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la oxidación de la superficie de la etapa b) se lleva a cabo en peróxido de hidrógeno con una concentración de entre 15 y 70 volúmenes a una temperatura de entre 20 °C y 80 °C durante un tiempo en el intervalo de 30-400 minutos.
- 30 6. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye, después de la etapa b) o la c), una etapa de funcionalización de la superficie de titanio o aleación de titanio con biomoléculas caracterizadas por la bioactividad biológica.
- 35 7. Un proceso según la reivindicación 6, en el que el tratamiento de funcionalización se realiza mediante:
- d) activación de la superficie de titanio o aleación de titanio, previamente tratada según las etapas a), b) y opcionalmente c), con un cloruro orgánico; e) incubación de las superficies activadas en una solución de la biomolécula elegida.
- 40 8. Un proceso según la reivindicación 7, en el que la etapa d) de activación se lleva a cabo con cloruro de trifluoretanosulfonilo a una temperatura de reacción de entre 20 °C y 50 °C, durante un tiempo incluido en el intervalo de 10 minutos a 72 horas.
- 45 9. Un proceso según las reivindicaciones 7 u 8, en el que la etapa e) de incubación se lleva a cabo remojando la superficie activada en una solución con una concentración en el intervalo de entre 2 y 40 mg/ml, durante un tiempo de 0,5 a 72 horas, a una temperatura de 0 °C a 50 °C.
- 50 10. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que dicha biomolécula ha sido elegida entre moléculas orgánicas, naturales o sintéticas, implicadas en procesos de mineralización de hueso.
- 55 11. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que dicha biomolécula es una biomolécula natural, recombinante o sintética, elegida entre bioadhesivos, factores de adhesión celular, biopolímeros, proteínas sanguíneas, enzimas, proteínas o biomoléculas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, hormonas, péptidos, ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), receptores, inhibidores enzimáticos, fármacos, aniones y cationes biológicamente activos, péptidos, proteínas morfogenéticas, monofosfato de adenosina (AMP), difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), albúmina, fibronectina, fosfatasa alcalina y combinaciones de las moléculas citadas anteriores.
- 60 12. Dispositivo implantable, particularmente artroprótesis o implante dental total o parcialmente constituido de titanio o aleaciones de titanio, con una superficie de titanio o aleación de titanio que se hace bioactiva mediante un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 con una superficie con grupos hidroxilo unidos a ella, estando la energía de enlace de dichos grupos hidroxilo en el intervalo de 531,5 - 532,2 eV.
- 65 13. Dispositivo implantable según la reivindicación 12, con una superficie de titanio o aleación de titanio que carece de grietas en la superficie que presenta rugosidad micrométrica en combinación con rugosidad-porosidad submicrométricas.
14. Dispositivo implantable según la reivindicación 12, en el que la superficie de titanio o aleación de titanio está funcionalizada con biomoléculas injertadas de modo covalente a la superficie.

15. Dispositivo implantable según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en forma estéril.

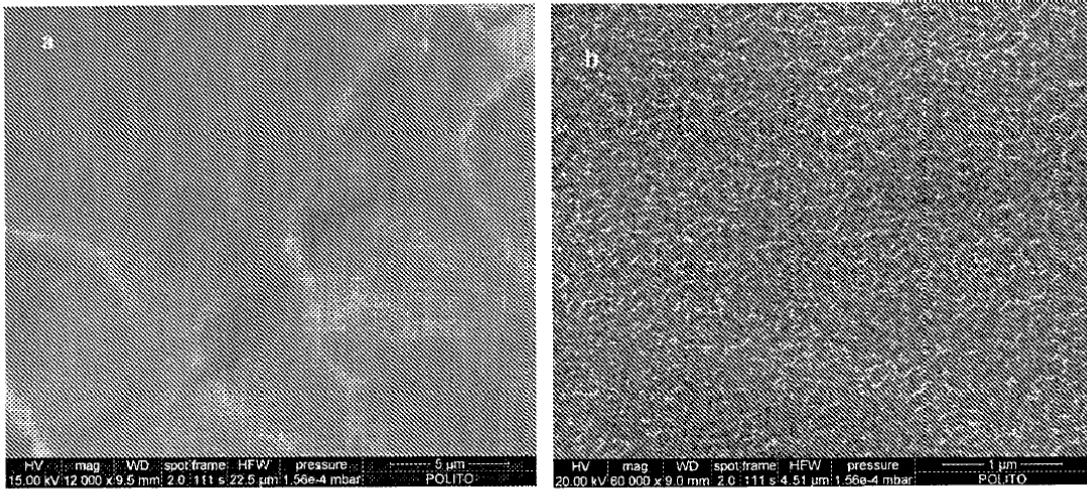
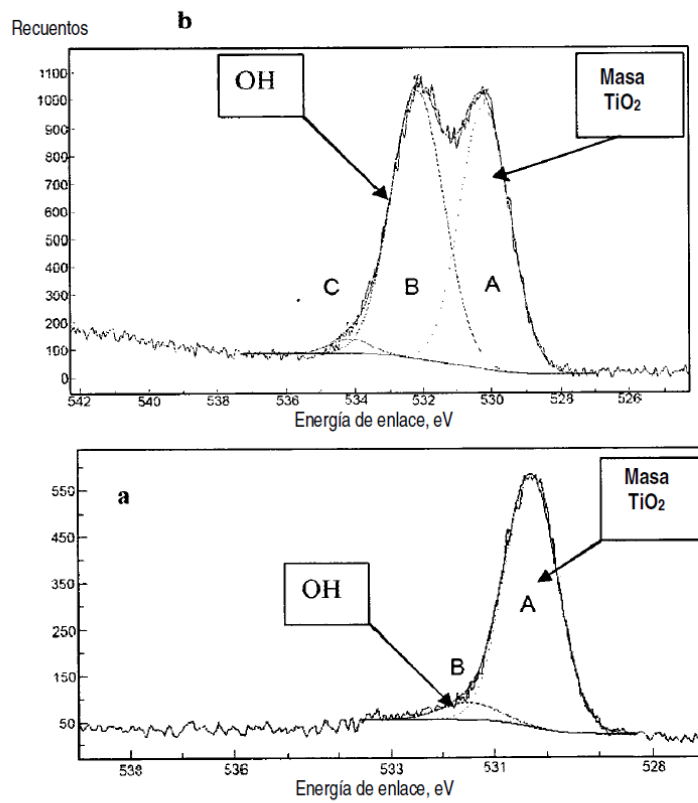


FIG. 1a

FIG. 1b



FIGS. 2a-2b



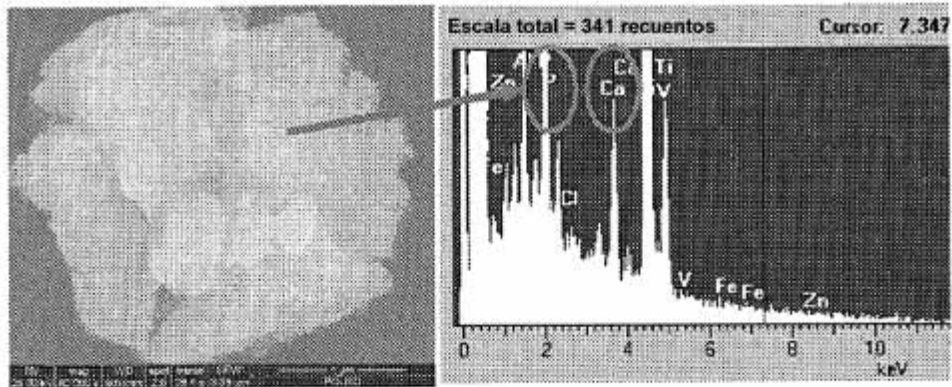


FIG.3

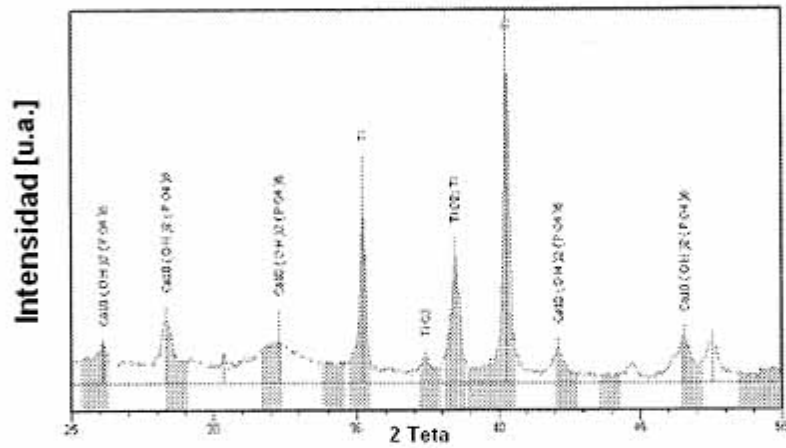


FIG.4

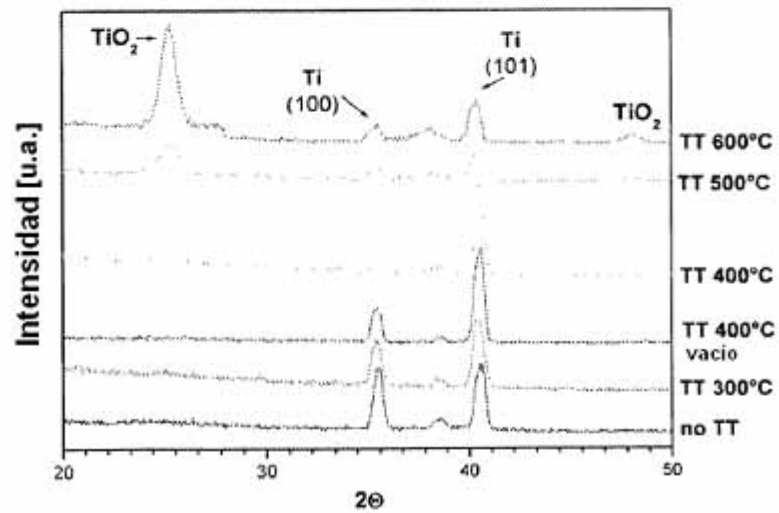


FIG.5

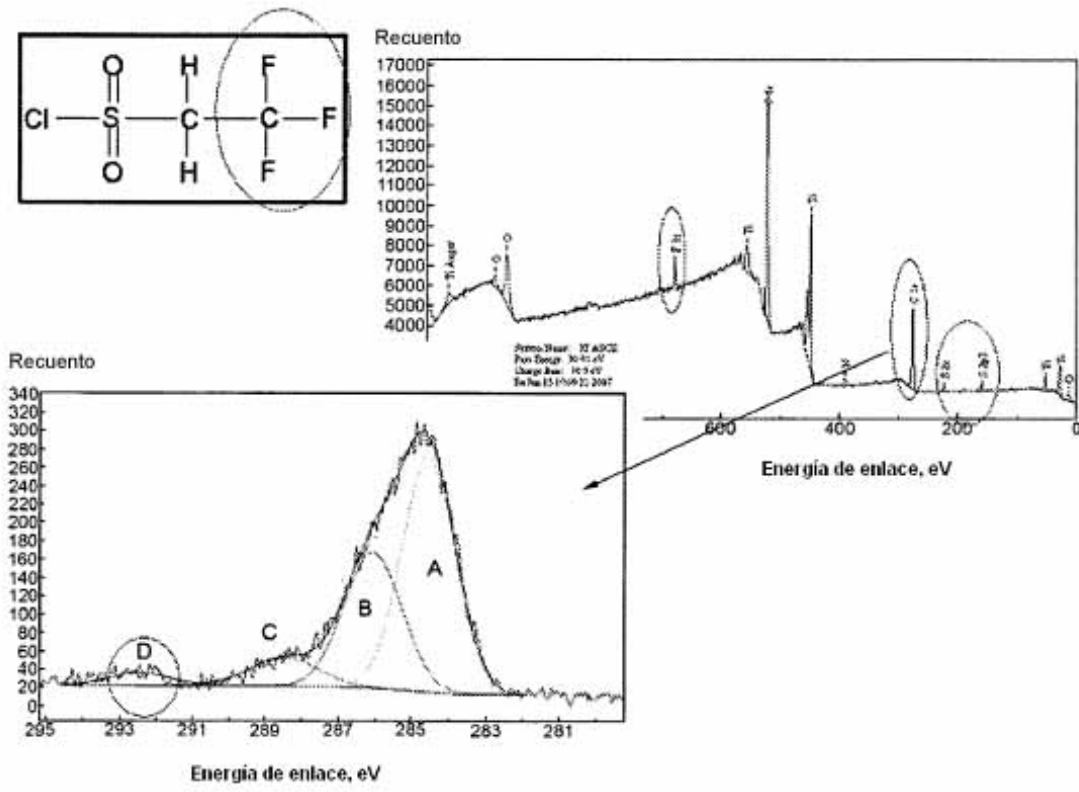
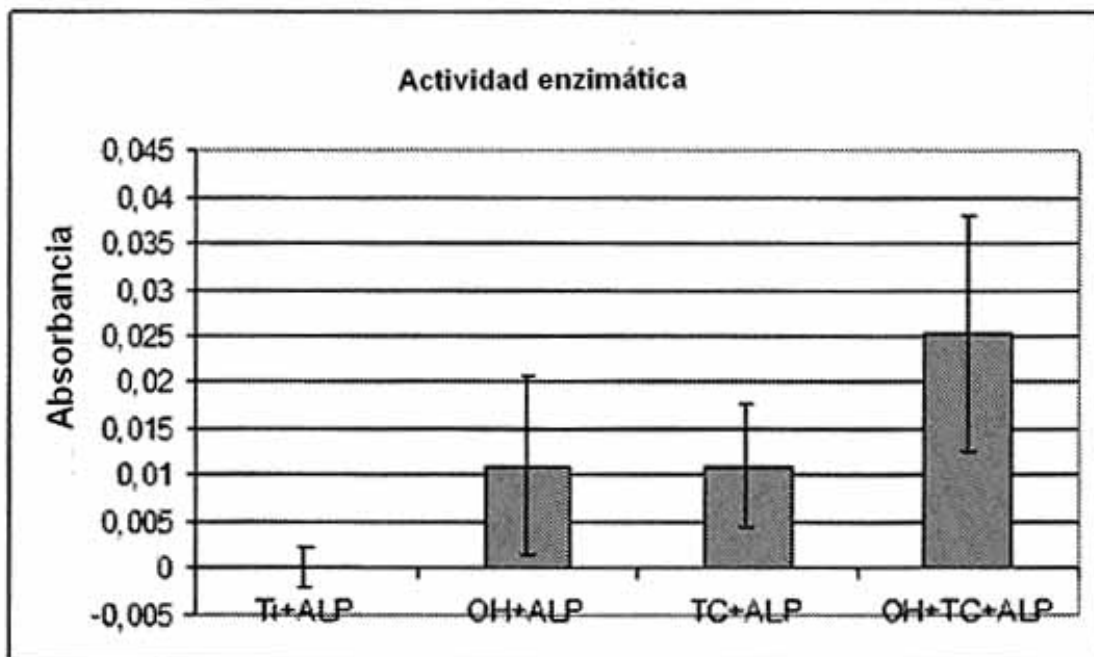
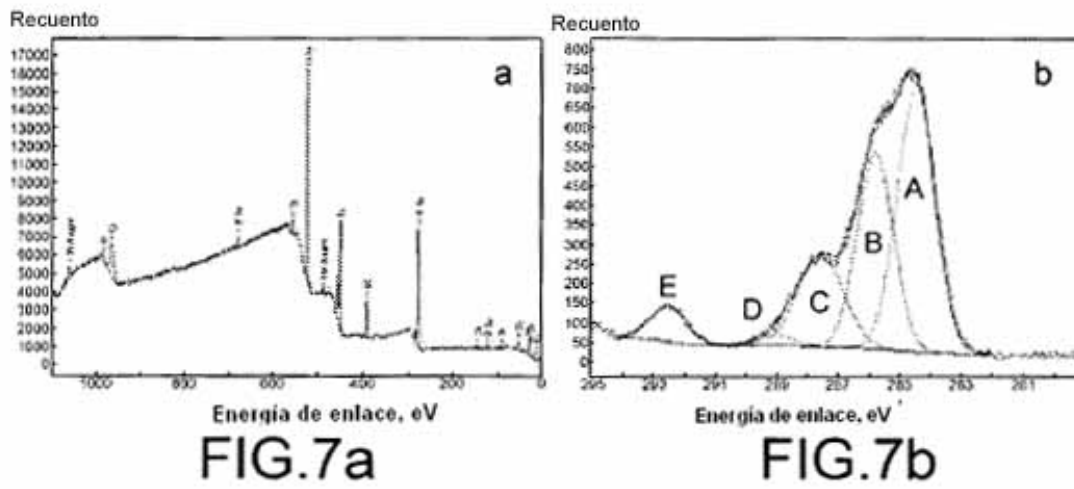


FIG.6



**FIG.8**