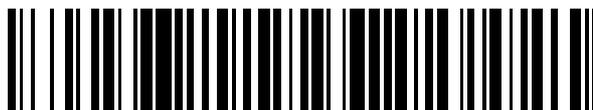


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 515**

51 Int. Cl.:

A61L 27/02 (2006.01)

A61L 27/34 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2009** **E 09760090 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013** **EP 2349359**

54 Título: **Implante médico con superficie biofuncionalizada**

30 Prioridad:

30.10.2008 DE 102008053892

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

30.10.2013

73 Titular/es:

**WESTFÄLISCHE HOCHSCHULE
GELSENKIRCHEN BOCHOLT RECKLINGHAUSEN
(100.0%)
Neidenburger Strasse 43
45877 Gelsenkirchen, DE**

72 Inventor/es:

**VEITH, MICHAEL;
LEHNERT, MICHAEL;
GENESIUS, KATHARINA;
MEYER, GERHARD;
LOIDL-STÄHLHOFEN, ANGELIKA y
GORBAHN, MIRIAM**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 427 515 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

Implante médico con superficie biofuncionalizada

5 La invención facilita un implante médico, en particular un implante dental con una superficie biofuncionalizada.

El implante de acuerdo con la invención comprende un núcleo y una biomolécula unida a través al menos de un ligador.

10 Un aspecto decisivo para la integración de implantes es el anclaje del implante. El experto conoce para esto una pluralidad de procedimientos, especialmente adaptados parcialmente para tipos de implante individuales. En tanto se trate a este respecto de implantes que se usan en la proximidad de huesos, el experto conoce diversos planteamientos para la modificación de la superficie del implante, que sean convenientes para una integración del implante en los huesos.

15 La forma más insignificante de la modificación de la superficie se refiere, a este respecto, a un raspado o una estructuración de la superficie del implante para la mejor incorporación en los huesos. Se menciona en este punto por ejemplo el documento WO 0224243 (*Method for surface treatment of implants or prosthesis made of titanium or other materials*), que en particular divulga implantes de hueso coxal y rodilla (prótesis) o el documento DE 102006011629 (*Verfahren zur Herstellung von Implantaten*).

20

Otro procedimiento para el fomento de la integración en los huesos es la colocación o aplicación de membranas sobre el implante con el objetivo de mejorar así la incorporación en los huesos, tal como se describe por ejemplo en el documento DE19948787 (*Medizinische Membran zur Anregung der Gewebebildung*), documento DE19748688 (*Membransystem zur gesteuerten Geweberegeneration bei Erkrankungen des Zahnhalteapparates*) y documento US20020133232 (*Microstructured dual sided membrane for tissue growth and regeneration*).

25

También se describe el uso de estructuras a modo de red de materiales biocompatibles como aditivo para la cicatrización de implantes (documento EP0310623B1 (*Biocompatible particles and cloth-like article made therefrom*)).

30

Además se divulga también la mineralización de la superficie mediante distintos revestimientos por ejemplo fosfato de calcio para la mejora de la integración en los huesos (documento DE3905608 (*Dentalimplantat*), documento EP1516602B1 (*Implant with bioactive particles stuck and method of manufacturing the same*) y documento EP0832619B1 (*Implant with embedded bioactive particles and method of manufacturing the same*)).

35

Otros revestimientos se colocaban en este caso sobre una capa de apatita nanocristalina (hidroxiapatita y flurapatita) con péptidos incluidos que representan secuencias parciales de proteínas de la matriz extracelular (EZM) y deben aumentar la integración de osteoblastos (documento WO06004778A2 (*Implant with a biofunctionalized surface and method for its production*)).

40

Igualmente se describen con frecuencia revestimientos de polímeros. Además de polímeros completamente sintéticos tales como PMMA, que se usa en la mayoría de los casos únicamente como capa media para la fijación de otras capas de polímeros (documento US4812120 (*Implantable percutaneous device*)), se usan cada vez con más frecuencia biopolímeros biológicos, propios del organismo como colágeno, ácido hialurónico o de ácido láctico y glicólico (documento US646138 (*Method and apparatus for augmenting osteointegration of prosthetic implant devices*)), documento EP0470305A1 (*Osteoprosthetic implant*)).

45

Otros usos encuentran polímeros que se degradan con el tiempo por sí solos y tras la incorporación del implante no dejan ya residuos en el organismo, los denominados "polímeros biodegradables" (documento DE60120660 (*Zusammensetzungen von vernetzbaren Prepolymeren für bioabbaubare implantate*)).

50

Igualmente se usan factores de crecimiento y moléculas de adhesión en implantes. En particular la proteína morfogénica ósea, *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) (documento US6214049 (*Method and apparatus for augmenting osteointegration of prosthetic implant devices*)) y proteínas de la EZM tales como fibronectina se usan en los más distintos revestimientos para la mejor o más rápida curación del implante en el hueso o también para soportes de implante (documento WO04010887A1 (*Arrangement for using osteoinductive or bioactive material to induce bone and/or increase the stability of implants in the jaw bone, and an implant intended for this purpose*)).

55

Un procedimiento indirecto que persigue el mismo objetivo que los documentos ya mencionados, pero no contiene ninguna modificación de las superficies de implante, es el uso de geles. Éstos se distribuyen o bien en el implante o durante la implantación en el tejido inmediato. En el documento (EP0726741 (*Implant assembly*)) se describe el uso del factor de crecimiento *Fibroblast Growth Faktor* (FGF) en geles con el objetivo de fomentar el crecimiento celular.

60

65

Además de la integración de larga duración de implantes, otro aspecto decisivo para el éxito de la implantación es la rapidez con la que se integra el implante absolutamente por primera vez en el tejido. Esto es en particular decisivo cuando pueden producirse infecciones en el sitio de la implantación.

- 5 Un ejemplo es la implantación de implantes dentales. En este caso puede llegarse a la penetración de bacterias que pueden provocar una periimplantitis.

Si bien algunas de las divulgaciones descritas anteriormente son no sólo adecuadas para garantizar un anclaje estable del implante, sino que también son adecuadas para acelerar el proceso de anclaje, sin embargo todas tienen en común que las enseñanzas allí divulgadas se refieren a un anclaje del implante en el hueso.

El riesgo de la aparición de una periimplantitis no se reduce sin embargo debido a ello.

15 Sólo algunos planteamientos persiguen el objetivo de aumentar la adhesión a fibroblastos en el implante para reducir, debido a ello, el riesgo de periimplantitis. Un procedimiento que va dirigido de nuevo a osteoblastos sin embargo también a fibroblastos peridontales es el uso de una matriz a modo de gel que se proporciona directamente antes de la implantación sobre la superficie del implante. El gel está compuesto de un material compuesto de colágeno/PMMA que contiene factores que deben estimular las células del periostio (documento DE19630034A1 ("Biohybrides Zahnimplantat")). Una posibilidad del revestimiento allí descrito está estructurada a modo de capas. La capa base sobre el núcleo de titanio es un polímero de PMMA o bis- γ -metacrilato con fibras de vidrio. Sobre esta capa se aplica una segunda capa del polímero anterior con fibras de colágeno incluidas. En éstas pueden estar incorporadas distintos metabolitos y moléculas tales como factores de crecimiento o fibronectina (documento DE3627316 ("Collagenimplantate, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung")). Otro planteamiento para el tratamiento de peridontitis se describe en el documento EP0404792 ("A method of treating conditions of teeth and their supporting tissue"). La pasta que contiene sulfato de sacarosa usada en este caso se aplica posteriormente sobre el sitio inflamado y debe contribuir a la cicatrización. Otro planteamiento para la adhesión de fibroblastos se describe en el documento WO07050130 ("Gold surfaces coated with a thermostable, chemically resistant polypeptide layer and applications thereof"). El implante de titanio se reviste con una capa delgada de oro. Sobre esta capa de oro pueden inmovilizarse proteínas de fusión mediante tio-funcionalización.

30 Además de las posibilidades mencionadas anteriormente se usan también sustancias propias del organismo tales como ácido hialurónico, quitosano y otras en el revestimiento de implantes dentales. Las películas de quitosano compuestas de quitosano y polímeros biológicamente degradables en combinación con una sustancia bioactiva por ejemplo antibióticos, hormonas, proteínas y BMP se usan para la mejor adherencia celular (documento EP1308177 ("Method for the production of chitosan-based films with enhanced cell adhering capacity, resulting product and applications")). Sin embargo, quitosano se usa también para el fomento de la integración ósea como único revestimiento (documento DE69733840 ("Implantierbarer kunstlicher Zahn beschichtet mit Chitosan")). Además se usan las sustancias propias del organismo en conexión con hidroxapatita también como material de carga para defectos de huesos o como coadyuvantes para la cubrición de éstos (documento DE2756256 ("Hilfsmittel zum Bedecken und/oder Ausfüllen von Knochendefekten und Verfahren zur Herstellung desselben")). Otro biomaterial compuesto de sustancias propias del organismo, que se usa como sustituto de huesos, se describe en el documento EP1142595 ("Biomaterials for bone replacement"). En este caso se usa ácido hialurónico y/o sus derivados junto con material óseo granular como material sustituto de huesos para defectos. Algunas divulgaciones se refieren a mejorar la compatibilidad con el tejido de implantes (documento DE10223310 ("Verfahren zum Beschichten von Implantaten mit einer Polysaccharid-Lage")).

50 No sólo se usan sustancias propias del organismo para aumentar la compatibilidad con el tejido. También se usan polímeros sintéticos o una combinación de polímeros sintéticos y biológicos, tal como se divulga en el documento DE4444445 ("Verfahren zur Herstellung gewebeverträglicher Substrate, gewebeverträgliches Substrat und seine Verwendung"). De acuerdo con esto se modifica un implante mediante un sustrato polimérico con un polímero hidrófilo de base sintética y/o biológica por medio de anclaje químico.

55 Por consiguiente, hasta ahora se le ha hecho sólo comparativamente poco caso a la importancia del fomento de la integración del implante en la encía en el desarrollo del implante y por consiguiente hasta ahora se soluciona sólo de manera muy insuficiente.

60 El raspado o la estructuración mencionados anteriormente de la superficie del implante repercute pues positivamente en el crecimiento del tejido óseo. Sin embargo en el tejido conjuntivo o la encía actúa una superficie rugosa más bien de manera perturbadora, dado que los fibroblastos prefieren superficies lisas. Debido a la inactividad de superficies de TiO_x (normalmente usadas) no se produce ninguna interacción química entre el implante y el tejido.

65 Tampoco los revestimientos de membrana conocidos por el estado de la técnica de los implantes (véanse por ejemplo los documentos citados anteriormente DE19948787, DE19748688 y US₂0020133232) son óptimos para la integración en el tejido de la encía, sino que a lo sumo están adaptados a una integración en el tejido óseo.

Lo mismo se aplica para la mineralización ya mencionada de los implantes.

5 El uso ya mencionado de biopolímeros propios del organismo tales como colágeno o GAG, sobre todo los ácidos hialurónicos, tal como se describe en los documentos EP0470305A1 (*"Osteoprosthetic implant"*), EP0404792 (*"A method of treating conditions of teeth and their supporting tissue"*), DE10223310 (*"Verfahren zum Beschichten von Implantaten mit einer Polysaccharid-Lage"*) o DE69733840 (*"Implantierbarer künstlicher Zahn beschichtet mit chitosano"*), crea un entorno que presenta componentes de la matriz extracelular y simula así el entorno natural de los fibroblastos de la encía. Mediante esto debe mejorarse el crecimiento celular. Los polímeros biológicos tales como por ejemplo colágeno y ácido hialurónico son componentes importantes de la EZM, sin embargo tienen funciones que proporcionan estructura (colágeno) o confieren a la matriz una resistencia a la presión y almacenan importantes sustancias de señal (GAG como ácido hialurónico). Sin la existencia de otros componentes de la matriz extracelular no es posible que estos biopolímeros fomenten un crecimiento celular, tal como se permite solamente de modo natural mediante los factores de crecimiento y proteínas de adhesión.

15 En caso de los factores de crecimiento extracelulares y moléculas de adhesión pasan a primer plano sobre todo miembros de las familias de las proteínas morfogénicas óseas (BMP), de FGF y fibronectina, o sus secciones secuenciales.

20 El uso de BMP, tal como se divulga en los documentos US6214049 (*"Method and apparatus for augmentating osteointegration of prosthetic implant devices"*), WO04010887A1 (*"Arrangement for using osteoinductive or bioactive material to induce bone and/or increase the stability of implants in the jaw bone, and an implant intended for this purpose"*) o EP1308177 (*"Method for the production of chitosan-based films with enhanced cell adhering capacity, resulting product and applications"*) sirve para la estimulación del crecimiento de huesos y con ello para la integración del implante en los huesos maxilares, lo que a su vez no tiene influencia sobre el crecimiento de los fibroblastos de la encía y por consiguiente no protege frente a la penetración de gérmenes patógenos en la cavidad de la herida y la periimplantitis generada posiblemente con ello.

30 Los FGF tienen una influencia directa sobre la proliferación de este tipo de célula (documento EP0726741 (*"Implant assembly"*)). FGF es una proteína de señal importante que influye en la proliferación de fibroblastos. Sin embargo influyen sólo poco en la propia adhesión a superficies de implante. Adicionalmente se parte de la base de que fibroblastos, a los que se simula su entorno extracelular mediante correspondientes moléculas de adhesión de manera suficientemente buena, independientemente comienzan a sintetizar una EZM e inician su propia proliferación. La etapa decisiva es por consiguiente la adhesión de estas células mediante moléculas de adhesión.

35 En el documento DE000003627316 (*"Collagenimplantate, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung"*) se usan fibras de colágeno. Adicionalmente se consideran otras sustancias que fomentan la adhesión (tal como fibronectina). La fibronectina en su entorno natural tiene acción adhesiva celular fuerte, tanto en caso de osteoblastos como también en caso de fibroblastos. La condición previa para la actividad biológica es sin embargo la existencia de la proteína en conformación nativa. En caso de unión inespecífica sobre superficies metálicas o incorporación en otras superficies es alto el riesgo de que se modifique la conformación, lo que puede conducir a una pérdida de la actividad. Sin embargo es sumamente cuestionable si estas moléculas pueden adoptar dentro de la capa polimérica generalmente su conformación natural y con ello mantener su función. Tampoco se usan otros componentes de la EZM para aumentar la medida de la biocompatibilidad.

45 El revestimiento de implantes, descrito en el documento WO07050130 (*"Gold surfaces coated with a thermostable, chemically resistant polypeptide layer and applications thereof"*), apunta igualmente a la mejora de la adhesión de fibroblastos. Sin embargo se usan sólo las secuencias de reconocimiento RGD y ninguna proteína completa. Esto es desventajoso dado que fibronectina dispone de una multiplicidad de interacciones intramoleculares (por ejemplo interacción entre tipo 3 de dominios 9 y 10), que aumenta adicionalmente la afinidad de unión de la proteína. Adicionalmente, la capa de cubierta de oro aplicada sobre la capa de titanio suprime todas las propiedades positivas bioinertes de un implante de titanio.

Tal como se ha mencionado ya, la implantación tiene de por sí el riesgo de infección.

55 Favorecido mediante un número fuertemente ascendente de implantaciones en odontología se aplica esto cada vez más también para el área dental. En este caso, la aparición de periimplantitis representa ahora como antes un problema significativo (véase por ejemplo Lang, H. y Borgert, S. (2008) *"Periimplantitis - eine therapeutische Herausforderung"* Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 63: 158-159). Si bien existen distintos planteamientos para la terapia de la periimplantitis (tratamiento por medio de antibióticos unido con una eliminación mecánica de la placa), sin embargo los resultados no son a menudo satisfactorios, representado también una carga para los pacientes. Un problema especial es que la aparición de una periimplantitis ahora como antes conduce frecuentemente a una pérdida del implante (Roos-Jansaker AM (2007) *"Long time follow up of implant therapy and treatment of periimplantitis"* Swed. Dent. J. 188: 7-66).

65 Generalmente es ventajoso cuando un posible revestimiento del núcleo del implante se pega de la manera más fija posible. Esto es por lo tanto ventajoso, dado que mediante esto se reduce el riesgo de que el revestimiento durante

el uso del implante, por ejemplo mediante sollicitación de cizallamiento o mediante otros deterioros, se retire, se desenrolle o similar.

5 También es generalmente ventajoso cuando un posible revestimiento de la zona de superficie del núcleo presenta una alta compatibilidad con el tejido.

Una adherencia insatisfactoria de otros revestimientos o una compatibilidad con el tejido insuficiente ha resultado hasta ahora con frecuencia problemática.

10 Un objetivo de la invención es facilitar implantes que presenten ventajas en comparación con los implantes del estado de la técnica.

Los implantes deben reducir en lo posible el riesgo de aparición de una inflamación en el sitio de la implantación.

15 En particular era un objetivo de la presente invención facilitar un implante cuyas propiedades sean adecuadas para reducir el riesgo de aparición de una periimplantitis en el sitio de la implantación en el área dental.

Este objetivo se soluciona mediante el objeto de las reivindicaciones.

20 La presente invención facilita un implante médico que comprende un núcleo, al menos un ligador L_1 , al menos un componente de biotina B_1 , al menos un componente de unión a biotina, al menos un componente de biotina B_2 y al menos una biomolécula, donde el ligador L_1 comprende un extremo proximal y un extremo distal, con el extremo proximal está unido covalentemente al núcleo y con el extremo distal está unido covalentemente al componente de biotina B_1 , donde entre la unión del ligador L_1 al núcleo y la unión del ligador L_1 al componente de biotina B_1 existen uniones covalentes de manera continua; el componente de biotina B_2 está unido covalentemente a la biomolécula; y el componente de unión a biotina presenta al menos un sitio de unión S_1 para el componente de biotina B_1 , al que el componente de biotina B_1 está unido no covalentemente, y presenta al menos un sitio de unión S_2 para el componente de biotina B_2 , al que el componente de biotina B_2 está unido no covalentemente; donde la biomolécula se selecciona del grupo que está constituido por biopolímeros, péptidos, proteínas y sacáridos.

30 Sorprendentemente se encontró que la estructura de un implante de este tipo es especialmente adecuada para obtener la estructura nativa de la biomolécula. Mediante la obtención de la estructura nativa se favorece la interacción con el tejido en el sitio de la implantación, que por consiguiente facilita la incorporación.

35 Es especialmente importante la existencia de la estructura nativa por ejemplo en el caso de la fibronectina. Esta proteína contiene distintas secuencias peptídicas cortas que son responsables de la interacción con las integrinas. En moléculas de fibronectina que no se encuentran en una conformación nativa, no se garantiza una orientación óptima de estas secuencias peptídicas.

40 El uso de componentes de biotina garantiza una unión fija e inmediatamente flexible de la biomolécula al núcleo.

La figura 1 muestra una representación esquemática y simplificada de una forma de realización preferente del implante de acuerdo con la invención. Al núcleo (1) está unido covalentemente el extremo proximal (2) del ligador L_1 . Al extremo distal (3) del ligador L_1 está unido covalentemente el componente de biotina B_1 . Entre la unión covalente del ligador L_1 al núcleo (1) en el extremo proximal (2) y la unión covalente del ligador L_1 al componente de biotina B_1 en el extremo distal (3) existen uniones covalentes de manera continua. A la biomolécula (5) está unido covalentemente el componente de biotina B_2 . El componente de unión a biotina (4) presenta dos sitios de unión S_1 y dos sitios de unión S_2 . A uno de los dos sitios de unión S_1 está unido no covalentemente el componente de biotina B_1 . A uno de los dos sitios de unión S_2 está unido no covalentemente el componente de biotina B_2 .

50 La figura 2 muestra una representación esquemática y simplificada de una forma de realización preferente del implante de acuerdo con la invención. Éste presenta dos ligadores adyacentes L_1 , que respectivamente están unidos covalentemente a través de su extremo proximal (2) al núcleo (1) y a través de su extremo distal (3) a respectivamente un componente de biotina B_1 . Los dos componentes de biotina B_1 de los dos ligadores adyacentes L_1 están unidos respectivamente no covalentemente a un sitio de unión S_1 del grupo de unión a biotina (4).

La figura 3 muestra una representación esquemática y simplificada de este tipo de una forma de realización preferente de este tipo del implante de acuerdo con la invención. Éste presenta cuatro ligadores adyacentes L_1 que respectivamente están unidos covalentemente a través de su extremo proximal al núcleo y a través de su extremo distal respectivamente a un componente de biotina B_1 . Los componentes de biotina B_1 de tres ligadores L_1 están unidos respectivamente no covalentemente a un sitio de unión S_1 de dos distintos grupos de unión a biotina. El componente de biotina B_1 del cuarto ligador está libre. La biomolécula está unida covalentemente a dos componentes de biotina B_2 que por su parte están unidos no covalentemente a dos sitios de unión S_2 de dos distintos componentes de unión a biotina.

65

La figura 4-A representa el núcleo (1), al que está unido el ligador L_1 con su extremo proximal (2). Al extremo distal (3) del ligador L_1 se une el componente de biotina B_1 . El componente de biotina B_1 está representado de manera aumentada.

5 La figura 4-B representa tanto los ligadores L_1' que no están unidos a componentes de biotina B_1 , como los ligadores L_1'' que están unidos covalentemente a componentes de biotina B_1 . Los ligadores L_1'' se unen al espaciador (1) del componente de biotina B_1 , que está unido al grupo principal (2) del componente de biotina B_1 .

10 La figura 5: derivado de ácido hialurónico adecuado para su uso en un implante de acuerdo con la invención, preferentemente en el ligador L_p del implante polimérico.

La figura 6: derivado de quitina adecuado para su uso en un implante de acuerdo con la invención, preferentemente en el ligador L_p del implante polimérico.

15 La figura 7: derivado de alginato adecuado para su uso en un implante de acuerdo con la invención, preferentemente en el ligador L_p del implante polimérico.

La figura 8: derivado de dextrano adecuado para su uso en un implante de acuerdo con la invención, preferentemente en el ligador L_p del implante polimérico.

20 La figura 9 muestra cinéticas de adsorción de fibronectina en distintas superficies de titanio.

25 El término "implante médico" o "implante" en el sentido de la presente invención caracteriza materiales y dispositivos que en el curso de una intervención quirúrgica se introducen al menos parcialmente en el tejido humano o animal. Estos implantes pueden estar en contacto con el hueso y otros elementos del aparato de apoyo y movimiento así como también en contacto con sangre o tejido conjuntivo.

30 El término comprende por ejemplo endoprótesis vasculares, endoprótesis intraluminales, endoprótesis, endoprótesis coronarias, endoprótesis periféricas, implantes quirúrgicos u ortopédicos para fines temporales tales como tornillos, placas, clavos y otros medios de fijación, implantes permanentes quirúrgicos u ortopédicos tales como prótesis de hueso o articulación, por ejemplo articulaciones coxales o de rodilla artificiales, piezas insertadas de codo, tornillos, placas, clavos, medios auxiliares de fijación ortopédicos implantables, medios sustitutivos de las vertebrae, así como corazones artificiales y partes de los mismos, válvulas cardíacas artificiales, carcasa de marcapasos cardíaco, electrodos, implantes subcutáneos y/o que pueden colocarse intramuscularmente, depósitos de principios activos y microchips y similares. En una forma de realización preferente se trata de catéteres que preferentemente se seleccionan de catéteres de balón, catéteres biliares y catéteres cardíacos. Los catéteres de este tipo pueden usarse en particular para fines diagnósticos y en intervenciones mínimamente invasivas.

40 Dependiendo del uso pueden modificarse el tipo y la propiedad de la biomolécula o de la mezcla de distintas biomoléculas. Un experto reconoce que determinados implantes como consecuencia de su entorno plantea determinados requerimientos. Si el implante debe permanecer de manera duradera en el organismo y se expone allí a acciones mecánicas, entonces es favorable con frecuencia cuando el tejido circundante se incorpora en el implante o al menos se adhiere.

45 Dependiendo del uso, sin embargo, puede ser también ventajoso cuando se evita precisamente un crecimiento celular en la superficie del implante.

50 En realizaciones especiales puede ser posible incluso que determinadas zonas de superficie del implante presenten propiedades que favorecen la adhesión de células, mientras que otras zonas de superficie de un y el mismo implante presenten propiedades que impiden la adhesión de células. Esto puede ser el caso por ejemplo en implantes dentales, en los que una zona de superficie debería cicatrizar según la posibilidad con la mandíbula, otra zona de superficie debería cicatrizar con la encía y otra zona de superficie no debería cubrirse en absoluto.

55 Se prefieren en el sentido de la presente invención implantes que en el momento de la implantación estén previstos para una implantación lo más duradera posible en el tejido, cuya eliminación no está proyectada, por tanto, desde el principio como parte de un tratamiento terapéutico constituido sea como sea.

60 El término "tejido" en el sentido de la presente invención comprende cualquier tejido de un organismo, preferentemente de un ser humano. Éste comprende por ejemplo tejido epitelial, tejido conjuntivo y tejido de sostén, tejido muscular, tejido nervioso y tejido óseo. Preferentemente éste comprende tejido conjuntivo y tejido de sostén. El término comprende, en tanto exista allí, el correspondiente tejido en cualquier órgano y/o zona parcial del organismo. Preferentemente, éste comprende el tejido, preferentemente el tejido conjuntivo y tejido de sostén, en el área dental, preferentemente del ser humano.

65 En el sentido de la presente invención, el término "implante médico" o "implante" comprende en particular implantes para la implantación en el área dental animal o, preferentemente, en el área dental humana (a continuación

denominado también “implante dental”). En esto se encuentran por ejemplo raíces artificiales que sirven para la fijación de coronas, puentes o prótesis, implantes completos, sin embargo también cualquier otra forma de implantes dentales.

5 Los implantes pueden fabricarse de una multiplicidad de materiales o pueden comprender cualquier material. A esto pertenecen por ejemplo plástico amorfo y/o (parcialmente) cristalino, material de carbono completo, carbono poroso, grafito, materiales compuestos de plástico, fibras de carbono, compuestos cerámicos tales como por ejemplo zeolitas, silicatos, óxidos de aluminio, silicatos de aluminio, carburo de silicio, nitruro de silicio; carburos metálicos, óxidos metálicos, nitruros metálicos, carbonitruros metálicos, oxicarburos metálicos, oxinitruros metálicos y oxicarbonitruros metálicos de los metales de transición tales como titanio, zirconio, hafnio, vanadio, niobio, tántalo, cromo, molibdeno, wolframio, manganeso, renio, hierro, cobalto, níquel; metales y aleaciones metálicas, en particular de los metales nobles oro, plata, rutenio, rodio, paladio, osmio, iridio, platino; metales y aleaciones metálicas de titanio, zircón, hafnio, vanadio, niobio, tántalo, cromo, molibdeno, wolframio, manganeso, renio, hierro, cobalto, níquel, cobre; acero, en particular acero inoxidable, aleaciones de memoria de forma tales como nitinol, aleación de níquel y titanio, vidrio, piedra, fibras de vidrio, minerales, sustancia de hueso natural o sintética, imitaciones de hueso a base de carbonatos de metal alcalinotérreo tales como carbonato de calcio, carbonato de magnesio, carbonato de estroncio, así como combinaciones adecuadas de los materiales mencionados en respectivamente una o varias fases.

10 20 En particular debido a los requerimientos específicos en el área dental, tal como por ejemplo una alta resistencia a la presión y una estabilidad química lo más alta posible en las condiciones del área dental, se prefieren especialmente algunos materiales para su uso en el área dental.

25 A los materiales preferentes para su uso en implantes dentales pertenecen por ejemplo metales tales como oro, platino y titanio o compuestos y/o aleaciones que contienen estos metales, prefiriéndose especialmente titanio como metal o sus óxidos. Además, a los materiales preferentes pertenecen también compuestos cerámicos que comprenden Al_2O_3 o compuestos cerámicos que comprenden óxidos de zirconio. Todos estos materiales pueden combinarse entre sí respectivamente también de manera adecuada y pueden encontrarse en respectivamente una o varias fases.

30 En particular, el implante puede comprender en su interior otros de estos materiales y/u otros materiales distintos de capas que se encuentran más hacia fuera.

35 En caso del ligador L_1 puede tratarse de una molécula lineal. Puede tratarse también de una molécula ramificada. Además del extremo proximal pueden estar unidos también aún otros extremos al núcleo. En una forma de realización está unido al menos uno de estos extremos libres, al menos uno, igualmente de manera covalente al núcleo.

40 La invención comprende implantes que comprenden ligadores L_1 que están unidos en el extremo distal covalentemente al componente de biotina B_1 . Estos ligadores L_1 se designan también como ligadores L_1' . Además del extremo distal pueden estar unidos también aún otros extremos a los componentes de biotina B_1 . En una forma de realización está unido al menos uno de estos extremos libres, al menos uno, igualmente de manera covalente a los componentes de biotina B_1 .

45 Los ligadores L_1 que no están unidos a un componente de biotina B_1 se designan también como ligadores L_1' .

50 En una forma de realización preferente, la biomolécula está unida de manera directamente covalente al componente de biotina B_2 , donde el componente de biotina B_2 puede subdividirse de manera análoga al componente de biotina B_1 igualmente en el grupo principal y el espaciador.

55 En otra forma de realización preferente, la biomolécula está unida a través de un ligador L_2 al componente de biotina B_2 . El ligador L_2 presenta un extremo proximal y un extremo distal. En caso del ligador L_2 puede tratarse de una molécula lineal. Puede tratarse también de una molécula ramificada. Todos los extremos del ligador L_2 tanto pueden estar unidos covalentemente a los componentes de biotina B_1 o a la biomolécula como pueden encontrarse también libres. Además del extremo proximal pueden estar unidos también aún otros extremos a los componentes de biotina B_1 . En una forma de realización está unido al menos uno de estos extremos libres, al menos uno, igualmente de manera covalente a los componentes de biotina B_1 . Además del extremo distal pueden estar unidos también aún otros extremos a la biomolécula. En una forma de realización está unido al menos uno de estos extremos libres, al menos uno, igualmente de manera covalente a la biomolécula.

60 El término “proximal” o “extremo proximal” o similar en el sentido de la presente invención designa el extremo de una molécula que en el implante de acuerdo con la invención, en comparación con el extremo distal de la molécula, está dirigido hacia el núcleo.

65 El término “distal” o “extremo distal” o similar en el sentido de la presente invención designa el extremo de una molécula que en el implante de acuerdo con la invención, en comparación con el extremo proximal, está opuesto al

núcleo.

El término "covalentemente de manera continua" en el sentido de la presente invención significa que entre las moléculas unidas puede encontrarse una cadena, al menos supuestamente lineal, de átomos con un extremo proximal y un extremo distal, en el que los respectivos átomos están unidos con el átomo que se encuentra respectivamente de manera proximal y el átomo que se encuentra de manera distal mediante una unión covalente.

En una forma de realización preferente existen exclusivamente uniones covalentes entre el átomo que se encuentra de manera proximal y el átomo que se encuentra de manera distal.

El componente de biotina en el sentido de la presente invención comprende un grupo principal.

El término "grupo principal" comprende tetrahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-2(3H)-ona así como todas las variantes, derivados y similares que se unen con una constante de asociación de al menos 10^8 M^{-1} , más preferentemente al menos 10^9 M^{-1} , aún más preferentemente al menos 10^{10} M^{-1} , de manera especialmente preferente al menos 10^{12} M^{-1} , de manera muy especialmente preferente al menos 10^{14} M^{-1} a una o varias de las moléculas avidina (números de registro NM_205320.1 / GI:45384353), neutravidina o estreptavidina (números de registro CAA00084.1 / GI:14606).

Adicionalmente, el componente de biotina comprende un espaciador. El extremo distal del espaciador está unido con la estructura de anillo de la biotina.

En el implante de acuerdo con la invención está unido el extremo proximal del espaciador del componente de biotina B₁ de manera directamente covalente con el extremo distal del ligador L₁.

En una forma de realización especial, el implante está caracterizado, por tanto, por que el componente de biotina comprende un espaciador que está unido covalentemente al extremo distal del ligador L₁.

El término "espaciador" comprende una molécula orgánica.

Un espaciador preferente es una subestructura molecular de acuerdo con la fórmula general 1



X designa el grupo principal del componente de biotina.

L designa el ligador.

p = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, preferentemente 4.

q = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, preferentemente 5.

z = 0, 1 ó 2, preferentemente 0 ó 1, de manera especialmente preferente 1.

R = cada resto R es independiente entre sí. Preferentemente, cada resto R se selecciona independientemente entre sí del grupo que está constituido por H y moléculas orgánicas.

De manera especialmente preferente cada resto R se selecciona independientemente entre sí del grupo que está constituido por H; alquilo, preferentemente alquilo C₁-C₆, de manera especialmente preferente seleccionado del grupo que está constituido por CH₃, C₂H₅, i-C₃H₇, i-C₄H₉, n-C₄H₉, sec-C₄H₉, terc-C₄H₉; alqueno seleccionado del grupo que está constituido por C₂H₃, i-C₃H₅, n-C₃H₅, n-C₄H₇, i-C₄H₇, sec-C₄H₇; donde los grupos alquilo y alqueno pueden portar uno o varios sustituyentes del grupo que está constituido por F, Cl, Br, I, CF₃, anillos saturados, insaturados o aromáticos de 3 a 7 miembros, opcionalmente con uno o varios heteroátomos seleccionados del grupo que está constituido por N, S, O. Cuando se encuentran varios heteroátomos en un anillo, éstos pueden ser iguales o distintos. Igualmente en una forma de realización especialmente preferente, dos restos R cualesquiera son parte de un anillo, donde este anillo puede ser saturado o insaturado y puede portar de 3 a 5 átomos de C y opcionalmente uno o varios heteroátomos seleccionados del grupo que está constituido por N, S y O. Cuando se encuentran varios heteroátomos en un anillo de este tipo, éstos pueden ser iguales o distintos.

De manera muy especialmente preferente es R = H.

En una forma de realización del implante de acuerdo con la invención, la distancia entre el grupo principal de biotina y la superficie del núcleo asciende a de 0,8 a 2 nm.

En una forma de realización especial está unido también el grupo principal del componente de biotina B₂ con un espaciador de acuerdo con la invención.

En una forma de realización preferente, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado por que el componente de biotina B₁ está unido al sitio de unión S₁ del componente de unión a biotina y/o el componente de biotina B₂ está unido al sitio de unión S₂ del componente de unión a biotina a través de una interacción no covalente con una constante de asociación de al menos 10⁹ M⁻¹.

5 En formas de realización especialmente preferentes, el componente de biotina B₁ está unido al sitio de unión S₁ del componente de unión a biotina y/o el componente de biotina B₂ está unido al sitio de unión S₂ del componente de unión a biotina a través de una interacción no covalente con una constante de asociación de al menos 10⁹ M⁻¹, aún más preferentemente al menos 10¹⁰ M⁻¹, de manera especialmente preferente al menos 10¹² M⁻¹, de manera muy especialmente preferente al menos 10¹⁴ M⁻¹.

El implante de acuerdo con la invención presenta por consiguiente, de manera condicionada por las constantes de asociación de la interacción no covalente, una alta estabilidad. Mediante la estructura de capa a modo de "sistema modular" presenta además una alta flexibilidad.

15 El experto conoce componentes de unión a biotina adecuados y/o éstos pueden identificarse mediante ensayos de unión sencillos, conocidos por el experto.

Una combinación especialmente adecuada es la combinación entre un componente de biotina y un componente de avidina o componentes de neutravidina o componente de estreptavidina.

En una forma de realización preferente se selecciona por consiguiente el componente de unión a biotina del grupo que está constituido por componentes de avidina, neutravidina y estreptavidina.

25 El término "componente de avidina" en el sentido de la presente invención se refiere a la proteína avidina de *Gallus gallus* (números de registro NM_205320.1 / GI:45384353). El término comprende adicionalmente todos los ortólogos de esta proteína. También están comprendidos homólogos de esta proteína o el respectivo ortólogo de esta proteína con un grado de homología al menos del 70 por ciento, preferentemente al menos del 80 por ciento, aún más preferentemente al menos del 90 por ciento, de manera especialmente preferente al menos del 95 por ciento, de manera muy especialmente preferente al menos del 98 por ciento, que se unen con una constante de asociación de al menos 10⁸ M⁻¹, más preferentemente al menos 10⁹ M⁻¹, aún más preferentemente al menos 10¹⁰ M⁻¹, de manera especialmente preferente al menos 10¹² M⁻¹, de manera muy especialmente preferente al menos 10¹⁴ M⁻¹ a una o varias moléculas de biotina de manera correspondiente al número PubChem 171548. Igualmente están comprendidos fragmentos que se unen con al menos las constantes de asociación mencionadas a biotina de manera correspondiente al número PubChem 171548. Igualmente están comprendidas variantes químicamente modificadas de estas proteínas o fragmentos que se unen con al menos las constantes de asociación mencionadas a biotina de manera correspondiente al número PubChem 171548. Las variantes químicamente modificadas pueden distinguirse por ejemplo por el grado y/o tipo de glicosilación. Están comprendidos los fragmentos que están expuestos en Hiller *et al.* (1991) *Biochem J.* 278: 573-85.

40 También están comprendidas las variantes completamente desglicosiladas de estas proteínas y fragmentos, en particular neutravidina.

45 El término "componente de estreptavidina" en el sentido de la presente invención se refiere a la proteína estreptavidina de *Streptomyces avidinii* (números de registro CAA00084.1 / GI:14606). Adicionalmente están comprendidos todos los ortólogos, homólogos, fragmentos y variantes químicamente modificadas de manera análoga a la definición del término "avidina".

50 Estreptavidina es una proteína tetramérica de aproximadamente 53.000 Da de tamaño, de la actinobacteria *Streptomyces avidinii*. Sus dimensiones ascienden a aproximadamente: 4,6 nm * 4,2 nm * 4,2 nm. Actúa como antibiótico natural que retira del entorno la vitamina H esencial para la supervivencia de microorganismos.

El uso de un componente de estreptavidina, preferentemente estreptavidina, como componentes de unión a biotina puede ser ventajoso, por consiguiente, con respecto a la prevención de una inflamación, en particular de una periimplantitis en el sitio de la implantación.

60 La estreptavidina está compuesta por cuatro subunidades idénticas. Cada una tiene un sitio de unión para la molécula biotina (vitamina H). Ésta se une por estreptavidina de manera sumamente específica a través de la interacción más intensa, no covalente que existe en la naturaleza (Kd = 10⁻¹⁵).

El experto conoce otros ejemplos específicos de componentes de avidina o componentes de estreptavidina o componentes de neutravidina.

65 Ciertos ejemplos están expuestos entre otros en el banco de datos de proteínas del *National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional para Información de Biotecnología (www.ncbi.nlm.nih.gov). Otros ejemplos son los mutantes de avidina descritos en el documento WO05047317A1 ("*Avidinmutants*"), las proteínas de

tipo avidina descritas en el documento WO06045891A1 (*"Avidin-like proteins from symbiotic bacteria"*), la avidina recombinante descrita en el documento WO0198349A2 (*"Recombinant avidin and its use in biotin binding"*), los derivados de avidina descritos en el documento WO0027814A (*"Avidin derivatives and uses thereof"*), las composiciones de avidina descritas en el documento WO971743A1 (*"Stable avidin composition and methods using same"*), los monómeros de estreptavidina descritos en el documento WO06084388A1 (*"Monomeric streptavidin muteins"*), los dímeros de estreptavidina modificados descritos en el documento WO06058226A2 (*"Modified dimeric streptavidins and uses thereof"*), las proteínas de unión a biotina descritas en el documento WO04018509A1 (*"improved mutants of biotin binding protein"*), la estreptavidina dimérica descrita en el documento WO0196530A2 (*"Dimeric streptavidins"*), los mutantes de estreptavidina descritos en el documento WO0011152A1 (*"Streptavidin mutants having secondary functional domains"*), la "estreptavidina multivariada" descrita en el documento WO9840396A1 (*"MULTIFLAVOR STREPTAVIDIN"*), las moléculas de avidina y estreptavidina modificadas descritas en el documento WO9700329A2 (*"Modified avidin and streptavidin molecules and use thereof"*), la avidina y estreptavidina modificadas descritas en el documento WO9640761A1 (*"Modified avidin and streptavidin and methods of use thereof"*), los mutantes de estreptavidina descritos en el documento WO9711183A1 (*"Streptavidin mutants"*), la estreptavidina con afinidad modificada descrita en el documento WO9624606A1 (*"Modified-affinity streptavidin"*) y la estreptavidina de núcleo recombinante descrita en el documento WO9309144A1 (*"Recombinant core-streptavidin"*). También éstos son componentes de avidina o componentes de estreptavidina o componentes de neutravidina en el sentido de la presente invención.

20 Se comercializan también distintas variantes. Ciertos ejemplos de esto son ExtrAvidin (Sigma-Aldrich), NeutrAvidin (Thermo Scientific), NeutrAvidin (Invitrogen) y Neutralite (Belovo). También éstas son componentes de avidina o componentes de estreptavidina o componentes de neutravidina en el sentido de la presente invención.

Además de la fuerza, la unión de biotina y estreptavidina tiene aún otras propiedades que se hacen interesantes para la bionanotecnología. Así se une únicamente la estructura de imidazol de la biotina, sin embargo no el grupo carboxilo. Éste está a disposición para otras modificaciones. Pueden acoplarse a estreptavidina moléculas o proteínas cualesquiera que dispongan de una modificación con biotina. Los cuatro sitios de unión se encuentran adicionalmente de forma tetraédrica en la proteína. Esto hace que una estreptavidina pueda unirse a hasta cuatro biotinas o puede unir moléculas modificadas con biotina. Así pueden generarse arquitecturas biológicas a nanoescala. La estreptavidina puede inmovilizarse de esta manera también a través de una molécula de biotina con correspondiente grupo de anclaje sobre superficies metálicas. En caso de titanio serían adecuados grupos fosfato y silano. (J. Spinke: Spezifische Proteinbindung an funktionalisierte, selbstorganisierte Adsorptionsschichten. Tesis doctoral, Universidad Johannes Gutenberg de Mainz; 1992; S. Busse: Untersuchung molekularer Erkennungsreaktionen mit einem integriert-optischem Mach-Zehnderinterferometer. Tesis doctoral, Universidad Johannes Gutenberg de Mainz; 2000).

La figura 1 muestra una representación esquemática y simplificada de este tipo de una forma de realización preferente del implante de acuerdo con la invención. Al núcleo (1) está unido covalentemente el extremo proximal (2) del ligador L_1 . Al extremo distal (3) del ligador L_1 está unido covalentemente el componente de biotina B_1 . Entre la unión covalente del ligador L_1 al núcleo (1) en el extremo proximal (2) y la unión covalente del ligador L_1 al componente de biotina B_1 en el extremo distal (3) existen uniones covalentes de manera continua. A la biomolécula (5) está unido covalentemente el componente de biotina B_2 . El componente de unión a biotina (4) presenta dos sitios de unión S_1 y dos sitios de unión S_2 . En uno de los dos sitios de unión S_1 está unido no covalentemente el componente de biotina B_1 . En uno de los dos sitios de unión S_2 está unido no covalentemente el componente de biotina B_2 .

En una forma de realización, los sitios de unión S_1 y S_2 son idénticos. Sin embargo también pueden ser distintos.

Se encontró en el contexto de la presente invención que es ventajoso cuando un componente de unión a biotina puede unirse respectivamente al mismo tiempo a al menos dos componentes de biotina B_1 .

En particular es, por tanto, ventajoso el uso de componentes de unión a biotina que disponen en total de al menos tres, preferentemente cuatro sitios de unión para componentes de biotina.

55 En una forma de realización preferente, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado, por tanto, por que dos componentes de biotina B_1 están unidos a dos sitios de unión S_1 de un componente de unión a biotina individual.

La figura 2 muestra una representación esquemática y simplificada de este tipo de una forma de realización preferente de este tipo del implante de acuerdo con la invención. Éste presenta dos ligadores adyacentes L_1 que respectivamente están unidos covalentemente a través de su extremo proximal (2) al núcleo (1) y a través de su extremo distal (3) a respectivamente un componente de biotina B_1 . Los dos componentes de biotina B_1 de los dos ligadores adyacentes L_1 están unidos respectivamente no covalentemente a un sitio de unión S_1 del grupo de unión a biotina (4).

65

Un implante estructurado de esta manera ofrece entre otras cosas una alta flexibilidad, sin embargo es también especialmente estable.

5 En particular es ventajoso el uso de los tetrámeros de los componentes de avidina, neutravidina o estreptavidina en el implante de acuerdo con la invención.

En un tetrámero de este tipo pueden unirse al mismo tiempo los dos sitios de unión S_1 a componentes de biotina B_1 como también los dos sitios de unión S_2 a componentes de biotina B_2 , de manera que se garantiza una alta estabilidad del implante de acuerdo con la invención.

10 Es ventajoso también cuando la biomolécula está unida a los componentes de unión a biotina a través de varias interacciones no covalentes con una constante de asociación de al menos 10^8 M^{-1} , más preferentemente al menos 10^9 M^{-1} , aún más preferentemente al menos 10^{10} M^{-1} , de manera especialmente preferente al menos 10^{12} M^{-1} , de manera muy especialmente preferente al menos 10^{14} M^{-1} .

15 En una forma de realización preferente, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado, por consiguiente, por que la biomolécula comprende dos componentes de biotina B_2 unidos covalentemente que están unidos respectivamente no covalentemente a componentes de unión a biotina.

20 También esto sirve para el aumento de la estabilidad.

En una forma de realización, los dos componentes de biotina B_2 están unidos respectivamente a la misma molécula de componente de unión a biotina. En otra forma de realización, los dos componentes de biotina B_2 están unidos respectivamente a distintas moléculas de unión a biotina.

25 La figura 3 muestra una representación esquemática y simplificada de este tipo de una forma de realización preferente de este tipo del implante de acuerdo con la invención. Éste presenta cuatro ligadores adyacentes L_1 que respectivamente están unidos covalentemente a través de su extremo proximal al núcleo y a través de su extremo distal respectivamente a un componente de biotina B_1 . Los componentes de biotina B_1 de tres ligadores L_1 están unidos respectivamente no covalentemente a un sitio de unión S_1 de dos distintos grupos de unión a biotina. El componente de biotina B_1 del cuarto ligador está libre. La biomolécula está unida covalentemente a dos componentes de biotina B_2 covalentemente, que por su parte están unidos no covalentemente a dos sitios de unión S_2 de dos distintos componentes de unión a biotina.

35 En una forma de realización preferente, el implante está caracterizado por que comprende una multiplicidad de componentes de biotina B_1 y una multiplicidad de componentes de unión a biotina con sitios de unión S_1 y S_2 , donde los componentes de biotina B_1 están unidos respectivamente a través del ligador L_1 covalentemente al núcleo y al menos una proporción de los componentes de biotina B_1 está unida no covalentemente a sitios de unión S_1 de componentes de unión a biotina iguales o distintos.

40 Puede variar la dimensión y la distribución de la zona de superficie a la que está unido covalentemente el ligador L_1 de acuerdo con la invención. Pueden estar unidos covalentemente ligadores L_1 tanto a toda la superficie como sólo a partes de la superficie.

45 En una forma de realización está unido covalentemente el ligador L_1 esencialmente sólo a la parte de la superficie que está prevista para el anclaje en el tejido, preferentemente el tejido de la encía.

También este caso puede diferenciarse la densidad de los componentes de biotina B_1 en distintas zonas del implante.

50 Por ejemplo, la zona del implante que no está prevista para un contacto con tejido, puede estar esencialmente libre del componente de biotina B_1 .

55 Otras zonas del implante pueden presentar distintas funcionalizaciones con distintas biomoléculas, por ejemplo dependiendo de para qué tejido (encía, tejido óseo o similares) están previstas o si se desea la acción adhesiva de células o acción anti-adhesiva de células (por ejemplo puede ser absolutamente indeseado un crecimiento de la encía en determinadas zonas del implante).

60 Por ejemplo pueden preverse implantes dentales tanto para el contacto con tejido óseo como con tejido de encía. En una forma de realización preferente, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado por que comprende al menos una zona en la que la concentración de superficie promedio de la totalidad de todos los componentes de biotina B_1 se encuentra en el intervalo de 1 - 10, preferentemente de 1 - 8, aún más preferentemente de 1 - 4, de manera especialmente preferente de 1 - 2, de manera muy especialmente preferente de 2 componentes de biotina B_1 por 24 nm^2 .

65

Preferentemente se trata en caso de esta zona de una superficie de al menos 1,0 mm², aún más preferentemente de una superficie de al menos 2,0 mm², aún más preferentemente de una superficie de al menos 30 mm², de manera muy especialmente preferente de una superficie de al menos 5,0 mm².

- 5 De acuerdo con la invención puede variarse la proporción molar de componentes de biotina B₁ con respecto a componentes de unión a biotina unidos.

10 En una forma de realización especial, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado por que la proporción molar relativa de componentes de unión a biotina con respecto a componentes de biotina B₁ se encuentra en el intervalo de 1 : 2 a 1 : 20, preferentemente en el intervalo de 1 : 2 a 1 : 10, de manera especialmente preferente en el intervalo de 1 : 2 a 1 : 8, de manera muy especialmente preferente en el intervalo de 1 : 2 a 1 : 4.

El experto conoce procedimientos correspondientes para la determinación de estas proporciones molares.

15 Un procedimiento de medición adecuado es la espectroscopia SPR con configuración de Kretschmann. Con un componente de biotina B₁ con un espaciador con los valores $p = 4$ y $q = 5$ se determina el aumento de espesor de capa en agua destilada. Se acepta para este componente de biotina un índice de refracción $n = 1,5$. Tras la medición se determina el espesor de capa mediante un ajuste de Fresnel. Éste debería encontrarse a 0,1 nm - 0,4 nm, de manera especialmente preferente a 0,1 - 0,2 nm. Con otro componente de biotina B₁ con un espaciador de fórmula general 1 con $p = 4$, $q = 5$ y $z = 2$ se mide en etanol y tras el ajuste de Fresnel debería ascender el espesor de capa a 0,1 nm - 0,7 nm, de manera especialmente preferente a 0,1 nm - 0,3 nm.

25 Una proporción de 1 : 2 significa en este caso que todos los componentes de biotina B₁ se unen a un componente de unión a biotina que contiene dos sitios de unión S₁.

También la proporción de biomoléculas con respecto a componentes de unión a biotina puede variarse.

30 Debido a ello puede variarse la densidad de las biomoléculas en el implante de acuerdo con la invención y por consiguiente puede adaptarse por ejemplo a determinados tejidos.

En una forma de realización especial, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado, por tanto, por que comprende distintas zonas de superficie con una superficie mínima de respectivamente 1,0 mm², a la que están unidas distintas biomoléculas o distintas mezclas de diferentes biomoléculas.

35 El experto sabe qué mezcla de biomoléculas es especialmente adecuada para qué zonas de superficie (por ejemplo zonas de superficie que están previstas para el contacto con tejido óseo o tejido de encía).

40 En una forma de realización especial, el espesor de capa de estreptavidina medido promedio asciende a al menos 3 nm - 4,4 nm, de manera especialmente preferente a 3,8 nm - 4,2 nm, de manera muy especialmente preferente a 4 nm. La medición del "espesor de capa" se realiza, a este respecto, preferentemente mediante espectroscopia SPR (*Surface Plasmon Resonance Spectroscopy*) y ajuste de Fresnel posterior. El índice de refracción aceptado para estreptavidina asciende según esto a $n = 1,45$. Se mide en PBS, NaCl o disoluciones comparables. Para la biomolécula, preferentemente para fibronectina, el espesor de capa medido promedio se encuentra preferentemente entre 1,5 - 7 nm, de manera especialmente preferente 3 - 6 nm, de manera muy especialmente preferente 4,5 nm. El índice de refracción aceptado para fibronectina asciende a $n = 1,4$. Se mide en PBS, NaCl o una disolución comparable.

50 Se ha mostrado que un aspecto importante para la unión del componente de unión a biotina al componente de biotina B₁ es la accesibilidad del componente de biotina B₁.

Adicionalmente se ha mostrado en el contexto de la invención que es esencial para la accesibilidad del componente de biotina B₁ que exista una cierta distancia entre el componente de biotina B₁ y otras moléculas.

55 En una forma de realización especial, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado, por consiguiente, por que contiene ligadores L₁' que no están unidos a componentes de biotina B₁, y contiene ligadores L₁" que están unidos covalentemente a componentes de biotina B₁, donde la distancia promedio (longitud teórica) de los extremos distales de los ligadores L₁" al átomo de azufre de los componentes de biotina B₁ asciende preferentemente a entre 0,5 y 5,0 nm, de manera especialmente preferente entre 0,9 y 4 nm, aún más preferentemente entre 1,4 y 2,7 nm, aún más preferentemente entre 1,4 y 2,0 nm, de manera muy especialmente preferente a 1,6 nm.

60 El término "átomo de azufre de los componentes de biotina" en el sentido de la presente invención se refiere al átomo de azufre en la estructura de anillo del grupo principal de biotina.

65 La figura 4 ilustra una representación esquemática y simplificada de este tipo de una forma de realización preferente de este tipo del implante de acuerdo con la invención.

La figura 4-A representa el núcleo (1) al que está unido con su extremo proximal (2) el ligador L₁. Al extremo distal (3) del ligador L₁ se une el componente de biotina B₁. El componente de biotina B₁ está representado de manera aumentada.

5 La figura 4-B representa tanto los ligadores L₁' que no están unidos a componentes de biotina B₁ como los ligadores L₁" que están unidos covalentemente a componentes de biotina B₁. Los ligadores L₁" se unen al espaciador (1) del componente de biotina B₁, que está unido al grupo principal (2) del componente de biotina B₁.

El extremo proximal del ligador L₁ puede unirse de manera y modo distintos covalentemente al núcleo.

10 En una forma de realización preferente, el extremo proximal del ligador L₁ está acoplado al núcleo a través de al menos un átomo de Si o P.

15 El átomo de Si o P puede ser parte de un grupo funcional. Ciertos grupos funcionales especialmente preferentes son silanos, siloxanos, fosfatenos, fosfonatos y fosforanos.

Por consiguiente, una forma de realización preferente del implante de acuerdo con la invención está caracterizada por que el átomo de Si o P es parte de un grupo funcional seleccionado de silanos, siloxanos, fosfatos, fosfonatos y fosforanos.

20 En una forma de realización preferente, estos grupos funcionales están funcionalizados en el extremo terminal.

La funcionalización puede realizarse por ejemplo tal como se describe a continuación:

25 El revestimiento de la capa de dióxido de titanio puede realizarse mediante adsorción química. La unión covalente y la activación de la capa de titanio para la modificación adicional se realiza mediante silanos funcionalizados en el extremo terminal o fosfonatos funcionalizados en el extremo terminal. La funcionalización puede realizarse mediante grupos amino, hidroxilo, carboxilo, epóxido, vinilo o un grupo iniciador de radicales tal como un derivado del peróxido de benzoílo o del 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo.

30 Según esto se usan preferentemente las siguientes estructuras moleculares de la fórmula general 2:



35 con p = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, preferentemente 2, 3 ó 4, de manera especialmente preferente 3; q = 0, 1 ó 2; preferentemente 1; o = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, preferentemente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, de manera especialmente preferente 5, 6, 7, de manera muy especialmente preferente 6.

40 X designa el grupo de anclaje, mediante el cual se establece la unión covalente a la superficie de titanio y se selecciona preferentemente del grupo que está constituido por silanos, siloxanos, fosfatenos, fosfonatos y fosforanos.

R = cada resto R es independiente entre sí. Preferentemente, cada resto R se selecciona independientemente entre sí del grupo que está constituido por H y moléculas orgánicas.

45 De manera especialmente preferente cada resto R se selecciona independientemente entre sí del grupo que está constituido por H; alquilo, preferentemente alquilo C₁-C₆, de manera especialmente preferente seleccionado del grupo que está constituido por CH₃, C₂H₅, i-C₃H₇, i-C₄H₉, n-C₄H₉, sec-C₄H₉, terc-C₄H₉; alqueno seleccionado del grupo que está constituido por C₂H₃, i-C₃H₅, n-C₃H₅, n-C₄H₇, i-C₄H₇, sec-C₄H₇; donde los grupos alquilo y alqueno pueden portar uno o varios sustituyentes del grupo que está constituido por F, Cl, Br, I, CF₃, anillos saturados, insaturados o aromáticos de 3 a 7 miembros, opcionalmente con uno o varios heteroátomos seleccionados del grupo que está constituido por N, S, O. Cuando se encuentran varios heteroátomos en un anillo, éstos pueden ser iguales o distintos. Igualmente en una forma de realización especialmente preferente, dos restos R cualesquiera son parte de un anillo, donde este anillo puede ser saturado o insaturado y puede portar de 3 a 5 átomos de C y opcionalmente uno o varios heteroátomos seleccionados del grupo que está constituido por N, S y O. Cuando se encuentran varios heteroátomos en un anillo de este tipo, éstos pueden ser iguales o distintos.

De manera muy especialmente preferente es R = H.

60 En una forma de realización del implante de acuerdo con la invención, el ligador L₁ comprende una estructura molecular de fórmula general 2. En una forma de realización preferente del implante de acuerdo con la invención, el ligador L₁ está constituido por una estructura molecular de fórmula general 4.

65 Además, la presente invención facilita un implante médico que comprende un núcleo, un ligador L_p y una biomolécula, donde el núcleo comprende una zona de superficie compuesta de un material inorgánico; el ligador L_p presenta un extremo proximal que se forma por un polímero que está en contacto con la zona de superficie; y la biomolécula se selecciona del grupo que está constituido por biopolímeros, péptidos, proteínas y sacáridos.

En el contexto de la presente solicitud se designa un implante de este tipo como "implante polimérico". Un implante polimérico de este tipo es un implante médico en el sentido de la presente invención.

5 El término "polimérico" en el sentido de la presente invención comprende polímeros que se producen tanto de manera sintética como de manera biológica. Por ejemplo, el polímero puede comprender sacáridos.

10 En una forma de realización preferente se selecciona el polímero del grupo que está constituido por sacáridos, preferentemente ácido hialurónico, alginato, dextrano, quitosano, quitina, heparina, sulfato de heparano, sulfato de dermatano, sulfato de condroitina y/o sus derivados, de manera especialmente preferente ácido hialurónico, alginato, dextrano, quitosano, quitina, heparina, sulfato de heparano, y polímeros sintéticos, usándose preferentemente poli(láctido-co-glicólico), poliláctido, poliglicólico, poli(β -hidroxibutirato), poli(p-dioxanona), poliéster, poliesteramida, poli(alcohol vinílico), policaprolactona. Como polímeros no degradables se usan preferentemente polietileno, polietilenglicol, polipropileno, poli(tereftalato de etileno), polietilenglicol, poli(metacrilato de metilo), poli(óxido de fenileno), polisulfona, policarbonato, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poliuretano, polivinil-N-pirrolidona, polisiloxano o poliacrilamida.

15 El peso molecular de los polisacáridos se encuentra preferentemente entre 250000 - 1000000 g/mol.

20 Ciertos ejemplos de derivados de ácido hialurónico adecuados están representados en la figura 4.

Ciertos ejemplos de derivados de quitina adecuados están representados en la figura 6.

Ciertos ejemplos de derivados de alginato adecuados están representados en la figura 7.

25 Ciertos ejemplos de derivados de dextrano adecuados están representados en la figura 8.

El término "está en contacto" en el sentido de la presente invención describe al menos una interacción del extremo proximal del polímero con la zona de superficie del núcleo.

30 En una forma de realización preferente, en caso de esta al menos una interacción se trata de una interacción directa.

Una "interacción directa" en el sentido de la presente invención significa que entre el polímero no se encuentra ninguna otra molécula.

35 Esta interacción directa comprende cualquier tipo de interacción química, por ejemplo de unión iónica, de uniones metálicas, de unión atómica, de unión de complejos, de interacción dipolo-dipolo (por ejemplo enlaces por puente de hidrógeno), de interacción dipolo-ion, de interacciones de Van-der-Waals.

40 En una forma de realización preferente, en caso de la interacción directa se trata sin embargo exclusivamente de interacciones no covalentes.

En una multiplicidad de usos es ventajoso obtener una capa polimérica a ser posible insoluble en agua e insensible a la hidrólisis.

45 En una forma de realización especial, el implante polimérico está caracterizado, por tanto, por que el implante comprende varios ligadores L_p que están reticulados entre sí.

50 Para la preparación de una capa polimérica insoluble en agua e insensible a la hidrólisis pueden reticularse los polímeros con una multiplicidad de reacciones químicas.

55 Para la reticulación pueden usarse distintas moléculas, por ejemplo diisocianato de hexametileno, compuestos de dialdehído tales como glutaraldehído, divinilsulfona, compuestos de diepoxi tales como etilenglicoldiglicidiléter, epiclorhidrina, dihidrazidas tales como octanodihidrazida, carbodiimidas, anhídrido del ácido metacrílico, ácido mercaptopropiónico.

Las moléculas de este tipo se designan como moléculas reticulantes.

60 El experto conoce otras moléculas reticulantes adecuadas. El experto también puede determinarse mediante ensayos sencillos otras moléculas reticulantes adecuadas.

También en el implante polimérico de acuerdo con la invención puede variar la dimensión y la distribución de la zona de superficie que se encuentra en contacto con el ligador L_p , así como la densidad del acoplamiento.

65 En una forma de realización, el ligador L_p se encuentra en contacto esencialmente sólo con la parte de la superficie que está prevista para el anclaje en el tejido, preferentemente el tejido de encía.

También puede variar la densidad de los ligadores L_p que están en contacto con la superficie.

De acuerdo con la invención, en el implante polimérico puede estar unida la biomolécula de manera y modo distintos.

5 En una forma de realización, el implante polimérico está caracterizado por que entre la biomolécula y el extremo proximal del ligador L_p existen uniones covalentes de manera continua.

10 En otra forma de realización, el implante polimérico está caracterizado por que entre la biomolécula y el extremo proximal del ligador L_p existe al menos una unión no covalente con una constante de asociación de al menos $10^8 M^{-1}$, más preferentemente al menos $10^9 M^{-1}$, aún más preferentemente al menos $10^{10} M^{-1}$, de manera especialmente preferente al menos $10^{12} M^{-1}$.

15 En una forma de realización preferente de esto, el implante polimérico está caracterizado por que la al menos una unión no covalente se forma (respectivamente) por un componente de biotina y un componente de unión a biotina.

20 En una forma de realización de esta forma de realización preferente, un componente de biotina está unido covalentemente al extremo distal del ligador L_p . Este componente de biotina está unido no covalentemente a un componente de unión a biotina. Este componente de unión está unido además no covalentemente a un componente de biotina que está unido covalentemente a la biomolécula.

25 En otra forma de realización de esta forma de realización preferente, un componente de unión a biotina está unido covalentemente al ligador L_p . Este componente de unión a biotina está unido no covalentemente a un componente de biotina que está unido covalentemente a la biomolécula.

El implante de acuerdo con la invención comprende un núcleo.

30 El término "núcleo" en el sentido de la presente invención es la parte interna del implante que contiene al menos en su zona de superficie una zona cerrada esencialmente hacia fuera, es decir que esencialmente no se abre camino desde el interior hacia fuera. El núcleo presenta una cierta medida de dureza.

Preferentemente éste presenta una dureza de al menos 6, preferentemente al menos 7, de manera especialmente preferente al menos 8, de manera muy especialmente preferente al menos 9 grados de dureza en la escala Mohs.

35 En formas de realización determinadas, el núcleo es de una fase, por tanto es una pieza moldeada de una masa esencialmente homogénea.

40 En otras formas de realización éste es de varias fases. Puede estar constituido por varias capas. También es posible que dentro del núcleo se encuentren distintos gradientes de concentración de componentes del núcleo.

El término "zona de superficie" en el sentido de la presente invención es la zona que delimita con el núcleo hacia el exterior. Con núcleos de una sola fase, la zona de superficie no puede delimitarse esencialmente mediante su composición de zonas del núcleo que se encuentran más en el interior.

45 En caso de núcleos de varias fases, por ejemplo en caso de núcleos con una estructura a modo de capa, puede delimitarse la zona de superficie mediante su morfología de zonas de otras capas que se encuentran más en el interior.

50 El espesor de capa de la zona de superficie asciende preferentemente a al menos $1 \mu m$, de manera especialmente preferente a al menos $2 \mu m$, de manera muy especialmente preferente a al menos $10 \mu m$.

El término "superficie" en el sentido de la presente invención designa la superficie dirigida hacia el exterior de la zona de superficie.

55 El término "material inorgánico" en el sentido de la invención comprende cualquier material que sea adecuado y eventualmente esté autorizado para la zona de superficie de implantes tal como se usan en medicina. El experto conoce materiales inorgánicos de este tipo. A esto pertenecen por ejemplo compuestos cerámicos y metales o compuestos metálicos. Como compuestos cerámicos se tienen en consideración por ejemplo compuestos cerámicos de óxido de zirconio, compuestos cerámicos de óxido de aluminio. Como metales se usan por ejemplo oro, platino y titanio o compuestos y/o aleaciones que contienen estos metales o sus compuestos.

En una forma de realización preferente, la zona de superficie del implante comprende titanio y/o un óxido de titanio.

65 Como óxidos de titanio se tienen en consideración óxido de titanio, dióxido de titanio u otros óxidos de titanio de fórmula general TiO_x , donde x se encuentra en el intervalo de 0 a 2.

De manera preferente, la zona de superficie del implante que comprende titanio y/o un óxido de titanio está esencialmente libre de oro o iones oro.

El implante de acuerdo con la invención comprende una biomolécula.

5 Preferentemente, el implante de acuerdo con la invención comprende varias biomoléculas distintas. Las biomoléculas pueden unirse de manera cuidadosa covalentemente a componentes de biotina B₂, si que se modifique la estructura eventualmente nativa de las biomoléculas en las condiciones de reacción necesarias para ello. Pueden obtenerse comercialmente numerosas biomoléculas enlazadas con biotina. De acuerdo con la invención pueden
10 unirse combinaciones o mezclas de distintas biomoléculas al mismo tiempo y no covalentemente al implante de acuerdo con la invención, de manera que puede crearse una superficie que se aproxima a un entorno natural que superficies que están cubiertas únicamente con un tipo individual de biomoléculas. La deposición de las biomoléculas en la superficie del implante se realiza a través del componente de biotina B₂ y por consiguiente es altamente selectiva, estable y especialmente cuidadosa.

15 El término "biomolécula" en el sentido de la presente invención comprende cualquier molécula orgánica que sea favorable para la incorporación del implante en el tejido.

20 Las biomoléculas en el sentido de la invención son biocompatibles, es decir son muy compatibles con sistemas biológicos. Con frecuencia son sustancias biocompatibles de origen biológico.

En una forma de realización preferente, el término "biomolécula" comprende biomoléculas que favorecen esencialmente la adhesión celular, es decir la biomolécula o las biomoléculas son favorables para la incorporación o crecimiento del tejido inmediato en el implante. En otra forma de realización preferente, el término "biomolécula"
25 comprende biomoléculas que impiden esencialmente la adhesión celular. El experto conoce representantes adecuados de los dos grupos de biomoléculas.

El experto puede determinarse mediante procedimientos de prueba conocidos en ensayos sencillos si una molécula es favorable para la incorporación del tejido en el implante.

30 En una forma de realización preferente, la densidad de la biomolécula en la superficie del implante o una superficie parcial del implante asciende a al menos 10 fmol/cm², más preferentemente al menos 100 fmol/cm², aún más preferentemente al menos 1 pmol/cm², lo más preferentemente al menos 10 pmol/cm² y en particular al menos 100 pmol/cm². La densidad de la biomolécula puede encontrarse claramente más alta dependiendo del tipo y uso, por ejemplo puede ascender a 20 nmol/cm².

Preferentemente, la biomolécula se selecciona del grupo que está constituido por biopolímeros, péptidos, proteínas y sacáridos.

40 El término "biopolímeros" en el sentido de la presente invención comprende todas las moléculas que contienen una estructura base de proteína. Esta estructura base de proteína está construida preferentemente por los 20 aminoácidos que se producen en la naturaleza. En caso de la estructura base de proteínas puede tratarse de proteínas o fragmentos de las mismas que se producen en la naturaleza. Tales fragmentos de una proteína pueden ser de distinta longitud, por ejemplo al menos de 20 aminoácidos o al menos de 30 aminoácidos (en tanto que la proteína correspondiente sea al menos así de larga) o al menos de 40 aminoácidos (en tanto que la correspondiente proteína sea al menos así de larga) o al menos de 50 aminoácidos (en tanto que la correspondiente proteína sea al menos así de larga) o al menos de 60 aminoácidos (en tanto que la correspondiente proteína sea al menos así de larga).

50 Los fragmentos que sean más cortos de 20 aminoácidos se designan en el sentido de la presente invención como péptidos.

Puede tratarse también de proteínas que presentan una homología de al menos el 70 por ciento, preferentemente al menos el 80 por ciento, aún más preferentemente al menos el 90 por ciento, de manera especialmente preferente al menos el 95 por ciento, de manera muy especialmente preferente al menos el 98 por ciento con respecto a una proteína que se produce naturalmente o a un fragmento de una proteína que se produce naturalmente de este tipo.

60 Además de esta estructura base de proteínas, la biomolécula puede contener distintas cadenas laterales. Por ejemplo puede glicosilarse, acetilarse, alquilarse, biotinilarse, formilarse, carboxilarse, glutaminilarse, hidroxilarse, prenilarse, farnesilarse, miristoilarse, palmitoilarse, pegilarse, fosforilarse o puede acoplarse por ejemplo con nucleótidos, fosfatidilinositol.

65 En caso de estas cadenas laterales puede tratarse de cadenas laterales que se producen en proteínas naturales o también de otras cadenas laterales. También puede contener la molécula además de la estructura base de proteínas mencionada otras cadenas que contienen aminoácidos.

El experto puede determinar, en base a distintos procedimientos de prueba conocidos mediante ensayos sencillos cuál de estas moléculas son adecuadas para su uso en el implante de acuerdo con la invención.

5 Preferentemente se trata en caso del biopolímero de un biopolímero que es un componente de la matriz extracelular del tejido en el sentido de la presente invención o un homólogo, fragmento o variante de un componente de este tipo.

10 La grado de homología del homólogo o del fragmento o de la variante asciende a preferentemente al menos el 70 por ciento, preferentemente al menos el 80 por ciento, aún más preferentemente al menos el 90 por ciento, de manera especialmente preferente al menos el 95 por ciento, de manera muy especialmente preferente al menos el 98 por ciento.

15 De manera especialmente preferente, el biopolímero se selecciona del grupo que está constituido por proteínas de adhesión, preferentemente fibronectina, vitronectiona, fibrinógeno, tenascina o trombospondina; factores de crecimiento, preferentemente de la familia de las proteínas morfogénicas óseas, *Bone Morphogenic Proteins*, o factor de crecimiento de fibroblastos, *Fibroblast Growth Factor*, proteínas de matriz, preferentemente colágeno.

Se prefiere muy especialmente fibronectina o una mezcla que contiene al menos otra biomolécula de fibronectina.

20 En una forma de realización especial, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado, por tanto, por que la biomolécula se selecciona del grupo que está constituido por proteínas de adhesión, preferentemente fibronectina, vitronectiona, fibrinógeno, tenascina o trombospondina; factores de crecimiento, preferentemente proteína morfogénica ósea o factor de crecimiento de fibroblastos; proteínas de matriz, preferentemente colágeno.

25 Las moléculas de adhesión tales como fibronectina se conocen por su acción múltiple en el organismo. Mediante la interacción con integrinas y otras moléculas receptoras producen las más distintas reacciones en las células unidas tales como diferenciación, adhesión, proliferación y otros mecanismos celulares. Es posible el uso para la acción dirigida sobre distintos tipos celulares tales como osteoblastos, condrocitos o fibroblastos. La fibronectina es una glicoproteína dimérica de aproximadamente 520.000 Da de tamaño. Sin embargo pueden obtenerse por ejemplo
30 comercialmente también variantes de fibronectina que comprenden otro peso molecular, por ejemplo de aproximadamente 440 kDa. Las dos subunidades de la proteína tienen una estructura casi idéntica. Como componente del tejido conjuntivo, ésta tiene sobre todo un papel central como proteína ligadora entre la EZM y las células introducidas aquí, favoreciendo así la adhesión celular. Esto se realiza a través de un enlace entre las fibrillas de colágeno de la matriz, en las que están incorporadas las moléculas de fibronectina, y las integrinas que
35 están localizadas en superficies celulares. La fibronectina se forma en el espacio extracelular de fibroblastos, que inician su adhesión por consiguiente de manera independiente. La proteína está constituida por tres tipos modulares que se repiten (tipo modular 1 - 3), donde el tipo modular 3 con 15 - 17 repeticiones por subunidad es el módulo que se produce con más frecuencia en fibronectina. Adicionalmente es el módulo más grande con aproximadamente 90 aminoácidos y al mismo tiempo más importante. Contiene una sección de secuencia corta que está constituida por
40 los tres aminoácidos: arginina, glicina y ácido aspártico (secuencia RGD). Esta secuencia cíclica se une a una secuencia señal de las integrinas unidas a la membrana y provoca así el anclaje de los fibroblastos en la EZM. El tripéptido RGD se descubrió en 1984 por Pierschbacher y Ruoslahti como secuencia de adhesión celular esencial mínima en fibronectina y se identificó como epítipo de unión para integrinas. Pudo mostrarse que los péptidos RGD inmovilizados provocaban, de manera similar a proteínas de ECM, una adhesión celular mediada por integrina, mientras que los péptidos RGD solubles despegaban las células adheridas de manera antagonista a la ECM.
45

El colágeno como componente de la EZM se pone en contacto igualmente tal como se ha mencionado anteriormente, con estas moléculas de adhesión y se encarga de una unión y presentación para la interacción con receptores unidos a membrana. El colágeno es un biopolímero reticulado que aparece en muchas variaciones en el
50 organismo y por tanto es muy adecuado por tanto como base de revestimiento. El colágeno es absolutamente la proteína más frecuente en el organismo. Está constituido por tres cadenas peptídicas de colágeno individuales enrolladas una alrededor de la otra. Esta triple hélice con un diámetro de 1,5 nm se une para dar fibrillas de colágeno más gruesas con un diámetro de 10 - 300 nm, dependiendo del tipo. A partir de esto se forman a su vez fibras de colágeno con un espesor de 0,5 - 3 µm. El colágeno determina la resistencia a la tracción y el carácter del
55 tejido conjuntivo. Esto se produce por un lado mediante la concentración de las fibras de colágeno y por otro lado mediante su disposición.

Otros componentes adecuados de la matriz extracelular son por ejemplo las lamininas.

60 Todos estos biopolímeros pueden combinarse de distinta manera entre sí y con otras biomoléculas.

El término "péptido" en el sentido de la presente invención comprende moléculas que comprenden una cadena de aminoácidos de hasta 19 aminoácidos.

65 También los péptidos pueden modificarse, de manera análoga a los biopolímeros, con cadenas laterales.

En particular comprende el término secuencias peptídicas que interaccionan con las integrinas existentes en el tejido, preferentemente las integrinas $\alpha_5\beta_1$. Ciertos ejemplos de tales secuencias peptídicas son RGD-, RGDS-, GRGD-, GRGDS-, GRGDY-, YRGDG-, GRGDSP-, GRGDSY-, GRGDSPK-, CGRGDSY-, RGDSPASSKP- y ciclo(RGDfK).

5 En una forma de realización especial, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado, por tanto, por que la biomolécula es un péptido que se selecciona del grupo que está constituido por RGD-, RGDS-, GRGD-, GRGDS-, GRGDY-, YRGDG-, GRGDSP-, GRGDSY-, GRGDSPK-, CGRGDSY-, RGDSPASSKP- y ciclo(RGDfK).

10 En una forma de realización preferente, la densidad asciende a $10 \text{ fmol de péptido/cm}^2 - 20,5 \text{ nmol/cm}^2$.

Todos estos péptidos pueden combinarse de distinta manera entre sí y con otras biomoléculas.

15 Para que las secuencias peptídicas cumplan óptimamente su fin, es ventajoso inmovilizar los péptidos a una cierta distancia con respecto a la superficie. Esto puede garantizarse mediante el uso de moléculas "espaciadoras". La longitud de la molécula "espaciadora" se encuentra preferentemente entre 11-46 Å. Como molécula "espaciadora" pueden usarse tanto cadenas hidrófilas como hidrófobas. Por ejemplo pueden usarse unidades de ácido aminohexanoico, de glicina que se repiten u oligo(etilenglicoles).

20 Además de las cadenas lineales de molécula "espaciadora" y únicamente un péptido acoplado, existe la posibilidad de usar una cadena de molécula "espaciadora" ramificada con varios péptidos acoplados. O una cadena de molécula "espaciadora" ramificada con también únicamente un péptido acoplado.

25 El término "sacárido" en el sentido de la presente invención comprende tanto monosacáridos como disacáridos como polisacáridos.

En una forma de realización preferente, el sacárido se selecciona del grupo que está constituido por ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparina, sulfato de dermatano, sulfato de condroitina, alginato, dextrano, quitosano y quitina.

30 En una forma de realización especial, el implante de acuerdo con la invención está caracterizado, por tanto, por que el sacárido se selecciona del grupo que está constituido por ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparina, sulfato de dermatano, sulfato de condroitina, alginato, dextrano, quitosano y quitina.

35 Otro componente de la EZM son los glicosaminoglicanos (GAG). Los GAG son polisacáridos ácidos, lineales, contruidos por disacáridos que se repiten. Tienen la capacidad de almacenar agua y garantizan que el tejido presente una cierta resistencia a la presión. A los GAG pertenecen ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparina, sulfato de dermatano y sulfato de condroitina. Éstos son biocompatibles y biodegradables y además de la estabilización y organización del tejido regulan la adhesión celular, la proliferación celular y la diferenciación. Por consiguiente, el ácido hialurónico (HA) y sus derivados encuentran un amplio campo de aplicación en el sector

40 médico.

El ácido hialurónico es un GAG sencillo de la EZM y se produce como único GAG no como proteoglicano. Se sintetiza en la superficie de los fibroblastos y puede obtenerse además también de manera biotecnológica. El ácido hialurónico es un compuesto de alto peso molecular con un peso molecular entre 50000 y varios millones de Dalton. El componente básico es un aminodisacárido constituido por ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina en enlace β -1,3-glicosídico, que está unido entre sí de manera β -1,4-glicosídica. El ácido hialurónico se produce en articulaciones, el cuerpo vítreo del ojo, en la piel, por tanto es un producto propio del organismo e interacciona con receptores de superficie celular. Los más conocidos de los receptores son el receptor CD44 y Rhamm (*Receptor hyaluronic acid mediated motility*). Además se encontró aún un gran número de otras proteínas de unión, cuya función se conoce sin embargo sólo parcialmente. Los receptores celulares que se unen a ácido hialurónico conducen información a través de las distintas vías de transducción de señal, que incluyen la regulación de proteínas cinasas y GTPasas, hacia el citoesqueleto e influyen así en el crecimiento de las células. La molécula de ácido hialurónico presenta distintos grupos funcionales que pueden modificarse mediante reacciones químicas.

50 Éstos son los grupos carboxilo, los grupos hidroxilo, los grupos amino secundario y tras desacetilación también los grupos amino primario, que son accesibles para la derivatización química. Otra posibilidad consiste en la escisión de los anillos de azúcar por ejemplo mediante agentes oxidantes. En la bibliografía se encuentran muchas posibilidades de modificación (Bulpitt P., J. Biomed. Mater Res 47(2), 1999, 152-69; Luo Y, J ControlRelease, 69(1), 2000, 169-84; Vercruysse KP, Bioconj. Chem., 8(5), 1997, 686-94; T. Segura, Biomaterials 26, 2005,359-371). La escisión del

60 ácido hialurónico se realiza mediante hialuronidasas según un mecanismo de hidrólisis y mediante las hialuronatoliasas según un mecanismo de eliminación. Para impedir o ralentizar la degradación probablemente demasiado rápida en la superficie de implante modificada pueden estabilizarse el ácido hialurónico y sus derivados mediante reticulación transversal frente a la enzima de degradación. Para ello se remite a los procedimientos descritos de manera numerosa en la bibliografía. Las reacciones de reticulación son objeto de muchas patentes y se describen entre otras en las patentes US5510121, WO09802204 y EP161887.

65

Todos estos sacáridos pueden combinarse de distinta manera entre sí y con otras biomoléculas.

El experto sabe que la composición exacta de la matriz extracelular puede diferenciarse en tejidos individuales. Ciertos patrones de expresión de componentes de la matriz extracelular están descritos en bancos de datos pertinentes y en la bibliografía técnica.

De manera correspondiente a esto, el experto puede adaptar, eventualmente, el espectro de las biomoléculas en una forma de realización dada del implante de acuerdo con la invención de modo que éste puede incorporarse a ser posible rápidamente en el correspondiente tejido, lo que puede contribuir a que se reduzca el riesgo de una infección en el sitio de la implantación.

Preferentemente, el implante de acuerdo con la invención comprende una zona de superficie, a la que está unida una mezcla de biomoléculas, preferentemente fibronectina y al menos otra biomolécula. En una forma de realización preferente, la otra biomolécula se selecciona de la familia de las BMP (*Bone Morphogenic Proteins*). En este caso, la respectiva superficie es especialmente muy adecuada para el crecimiento de osteoblastos. En otra forma de realización preferente, la otra biomolécula se selecciona de la familia de los FGS (*Fibroblast Growth Factors*). En este caso, la respectiva superficie es especialmente muy adecuada para el crecimiento de fibroblastos.

En una forma de realización preferente, el implante de acuerdo con la invención combina zonas de superficie que son especialmente muy adecuadas para el crecimiento de fibroblastos con zonas de superficie que son especialmente muy adecuadas para el crecimiento de osteoblastos. La idoneidad especial de las respectivas zonas de superficie para el respectivo fin puede conseguirse mediante elección de biomoléculas adecuadas o sus mezclas que con ayuda de la invención pueden unirse de manera especialmente sencilla y cuidadosa a la superficie del implante.

El experto conoce procedimientos adecuados, con los que se garantiza que estén cubiertas determinadas zonas de superficie con determinadas biomoléculas o sus mezclas, y otras no. En este contexto puede remitirse por ejemplo a técnicas de enmascaramiento, por ejemplo técnicas litográficas. Sin embargo es posible también que los componentes individuales se revistan en primer lugar separadamente de manera distinta y solamente después de esto se unan para obtener el propio implante.

Esta forma de realización es adecuada en medida especial para implantes dentales. Estos implantes dentales comprende habitualmente una zona inferior, por ejemplo una rosca que está prevista para el anclaje del implante en la mandíbula, una zona media, por ejemplo una estructura a modo de anillo en el extremo superior de la zona inferior que se encuentra en contacto con la encía y una zona superior, por ejemplo una corona dental artificial o un adaptador sobre el cual puede colocarse una corona dental de este tipo. En una forma de realización preferente, la superficie de la zona media de un implante dental de este tipo es especialmente muy adecuada para el crecimiento de fibroblastos, lo que puede conseguirse por ejemplo mediante biomoléculas seleccionadas de fibronectina y FGS o sus mezclas. En otra forma de realización preferente, la superficie de una zona inferior de un implante dental de este tipo es especialmente muy adecuada para el crecimiento de osteoblastos, lo que puede conseguirse por ejemplo mediante biomoléculas seleccionadas de fibronectina y BMP o sus mezclas. En una forma de realización especialmente preferente están dispuestas tanto la zona inferior como la zona media de manera correspondiente.

También puede ser eventualmente ventajoso adaptar la biomolécula o el espectro de las biomoléculas usadas en un implante de manera específica a la situación en un determinado paciente. Motivos para esto pueden ser por ejemplo determinadas alergias de un paciente o un patrón de expresión individual de las moléculas de EZM en el sitio de la implantación.

Un revestimiento apropiado de un precursor del implante de acuerdo con la invención es fácilmente posible debido al sistema de capa de acuerdo con la invención.

Adicionalmente pueden usarse como biomoléculas, por ejemplo, anticuerpos o partes de anticuerpos frente a componentes de la matriz extracelular.

Como componente formador de estructura puede unirse colágeno biotinilado, en el que pueden incorporarse de manera inespecífica las proteínas de adhesión y/o los factores de crecimiento mencionados.

La estructura favorece el plegamiento nativo de las biomoléculas, lo que favorece la función. La distancia entre la superficie y la biomolécula puede variarse. Mediante el uso de sustancias propias del organismo, tales como colágeno y ácido hialurónico, así como sustancias compatibles con el organismo, tales como estreptavidina, la estructura del sistema de capas satisface en alta medida el requerimiento de la biocompatibilidad.

En determinadas circunstancias no sólo es deseable la adhesión de células en superficies de implante y con ello la incorporación del implante en el tejido, sino precisamente lo contrario, concretamente un impedimento del crecimiento del tejido en el implante.

Por ejemplo debe impedirse que endoprótesis colocadas nuevamente se cierren de nuevo por tejido que crece y se llegue así a una restenosis vascular. Además se reduce la vida útil de catéteres usados en el organismo humano cuando se produce en éstos un sobrecrecimiento del tejido. Tales catéteres deben sustituirse mediante operación, lo que representa una fuerte carga para los pacientes.

5 Han de mencionarse también en el presente documento, no en último termino, implantes dentales. Si bien debe fomentarse en éstos en determinadas zonas del implante el crecimiento del tejido (sobre todo del tejido blando), sin embargo no en todos los puntos del implante con la misma intensidad. Si crece, por ejemplo, la encía durante el proceso de cicatrización en los huesos, esto provoca en la mayoría de los casos un aflojamiento del implante en el
10 hueso maxilar y por consiguiente una vida útil acortada del implante colocado.

Esto son sólo algunos puntos que muestran que el impedimento del crecimiento de tejido en implantes igualmente representa un aspecto muy importante de la implantología. Al crecimiento de tejido le precede siempre una adhesión de células. A esto a su vez le precede la unión de proteínas que favorecen la adhesión celular o sobre todo la
15 permite.

Por consiguiente, el impedimento de la unión de proteínas que favorecen la adhesión representa la diana principal para el impedimento de la adhesión de tejido. Esto puede conseguirse tal como sigue:

20 Se conoce estreptavidina por su unión a biotina, que se describe también como la interacción más fuerte no covalente en la naturaleza con una constante de descomposición de $KON = 10^{15}$. Debido a esta fuerte interacción se usa también para el revestimiento de superficies para inmovilizar específicamente moléculas (biológicas) en una superficie a través de la interacción descrita anteriormente.

25 Esta función como "agente adherente" resulta mediante la disposición de los sitios de unión a biotina en la proteína. En este caso se encuentran opuestos respectivamente dos, de manera que pueden usarse dos, para unirse a superficies modificadas previamente con biotina, y los dos que quedan para inmovilizar específicamente a continuación otras proteínas biotiniladas en la monocapa de estreptavidina.

30 Se determinó ahora sorprendentemente que está monocapa tiene otra propiedad interesante: impide la unión inespecífica de proteínas no biotiniladas a superficies.

35 Está propiedad es especialmente interesante con respecto a una inhibición de la unión de proteínas que favorecen la adhesión, específicamente fibronectina, la proteína más importante en el área de la unión celular. Ésta interacciona con las integrinas en membranas celulares y una células así *in vivo* a la matriz extracelular (EZM).

Pudo demostrarse mediante mediciones por SPR que fibronectina se adsorbe de manera espontánea y sin otras influencias exteriores inespecíficamente en superficies de TiO_2 (espesor de capa óptico promedio de 5,8 nm). Si bien las proteínas inmovilizadas ya no tienen la misma actividad que tenían en caso de una inmovilización específica, sin embargo es suficiente esta actividad ya para favorecer una adhesión celular y por consiguiente la primera etapa de una adhesión de tejido en implantes de titanio.
40

La fibronectina forma, incluso en superficies de titanio activadas con amino, capas con una densidad comparable (6 nm). La unión de fibronectina es muy fuerte y ya no puede soltarse tampoco mediante lavado intenso. Sin embargo si se aplica una monocapa de estreptavidina sobre una superficie de titanio o sobre una superficie de titanio activada con amino, entonces prácticamente ya no se adsorbe fibronectina en esta superficie y las proteínas unidas pueden eliminarse de nuevo tras el ciclo de lavado casi completamente (espesor de capa óptico promedio de 0,4 nm). En la figura 9 se representa una correspondiente comparación de las cinéticas de adsorción de fibronectina (se lavó respectivamente tras 200 minutos).
50

Por consiguiente se abre la posibilidad de impedir completamente una unión de proteínas que favorecen la adhesión a superficies de implante de titanio (u otros materiales). Con ello está impedida igualmente la unión de células de tejido conjuntivo y con ello igualmente el crecimiento de tejido en tales superficies.

55 Además, la presente invención facilita un procedimiento para la fabricación de un implante de acuerdo con la invención. El procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado por que se acopla el núcleo con la biomolécula.

60 En función de la forma de realización específica del implante de acuerdo con la invención puede diferenciarse el procedimiento.

A modo de ejemplo están expuestas etapas de procedimiento en la presente solicitud. El experto puede complementar éstas mediante otras etapas necesarias o adaptar éstas con respecto a la fabricación de formas de realización específicas.
65

Los distintos implantes de acuerdo con la invención pueden usarse en una multiplicidad de tejidos para una multiplicidad de aplicaciones terapéuticas.

El experto conoce estas aplicaciones de las distintas formas de realización.

5 Por consiguiente, la presente invención comprende el uso de una biomolécula en el sentido de la presente invención para la fabricación de un implante de acuerdo con la invención.

10 En una forma de realización preferente del implante de acuerdo con la invención se trata de implantes dentales. Éstos se usan para el tratamiento de una multiplicidad de daños, lesiones etc. de la zona dental. En particular se usan para el tratamiento de daños dentales.

15 El término “daños dentales” en el sentido de la presente invención comprende la pérdida de uno o varios dientes, preferentemente que se encuentran uno junto a otro, o también otros daños de los dientes tales como una rotura de partes individuales, la rotura del diente, la eliminación de partes del diente.

Bajo esto se encuentran, por ejemplo, raíces artificiales que sirven para la fijación de coronas, puentes o prótesis, implantes completos, sin embargo también cualquier otra forma de implantes dentales.

20 Por consiguiente, la presente invención comprende el uso de una biomolécula para la fabricación de un implante de acuerdo con la invención para el tratamiento de daños dentales.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, sin que deban limitar éstos a la misma.

25 Ejemplos

1. Fabricación de un implante con ligador unido covalentemente y fibronectina unida por medio de interacción de estreptavidina-biotina

30 Procedimiento I

El sustrato de titanio se activa durante aproximadamente 60 minutos en un N-(6-aminohexil)aminopropil-trimetox-aminosilano 0,5 mM, disuelto en metanol. A continuación se extrae el sustrato, se purifica en profundidad con metanol y etanol y se incuba durante aproximadamente 220 minutos en una disolución 0,25 mM del derivado de succinimida sulfo-NHS-LCLC-biotina, disuelto en etanol. A continuación se extrae el sustrato, se lava en profundidad con el disolvente y tampón PBS y se incuba en una disolución de estreptavidina 0,5 mM, disuelta en tampón PBS, durante aproximadamente una hora. El sustrato se purifica a continuación en profundidad con tampón PBS y se incuba durante 200 minutos con el mantenimiento del disolvente en una disolución 25 nM de fibronectina biotinilada. Finalmente se purifica en profundidad el sustrato aún con mucho tampón PBS.

40

Procedimiento II

45 El sustrato de titanio se activa durante aproximadamente 60 minutos en un N-(6-aminohexil)aminopropil-trimetox-aminosilano 0,5 mM, disuelto en metanol. A continuación se extrae el sustrato, se purifica en profundidad con metanol y tampón PBS y se incuba durante aproximadamente 120 minutos en una disolución 0,5 mM del derivado de succinimida sulfo-NHS-LC-biotina, disuelto en H₂O destilada. A continuación se extrae el sustrato, se lava en profundidad con tampón PBS y se incuba en una disolución de estreptavidina 0,5 mM, disuelta en tampón PBS, durante aproximadamente una hora. El sustrato se purifica a continuación en profundidad con tampón PBS y se incuba durante 200 minutos con el mantenimiento del disolvente en una disolución 25 nM de fibronectina biotinilada. Finalmente se purifica en profundidad el sustrato aún con mucho tampón PBS.

50

Biotinilación: se disuelve fibronectina humana en agua altamente pura en una concentración final de 1 mg/ml. Igualmente se disuelven sulfo-NHS-biotina, sulfo-NHS-LC-biotina o sulfo-NHS-LC-LC-biotina brevemente antes de la reacción en agua altamente pura en concentraciones de como máximo 0,5 mg/ml. Se añaden conjuntamente fibronectina y reactivo de biotinilación en la proporción de 1:100 y se ajustan a una concentración final de 25 nM con PBS (pH 7,4). Se deja reaccionar la mezcla a 4°C durante 2 horas y a continuación se purifica.

55

2. Fabricación de implantes con un ligador que comprende un polímero (implante polimérico)

60 A) Inmovilización de ácido hialurónico con péptido RGD sobre titanio

Pretratamiento:

65 Antes de la modificación con el correspondiente polímero se desengrasa la capa de dióxido de titanio con un disolvente orgánico (acetona, etanol), a continuación se lava con agua y se seca con un flujo de nitrógeno. El revestimiento se realiza por medio de revestimiento por centrifugación o por inmersión. La capa debe tener un

espesor entre 1 μm y 500 μm .

Reticulación AH con un diepóxido

- 5 Se suspende ácido hialurónico (HA) ($\text{PM } 1 \times 10^6$) con una concentración de 10 mg/ml en una disolución de NaOH al 0,5%. Después de que se haya disuelto completamente el polímero se añade 1,4-butanodiol-diglicidiléter (BDDE). Por 1 mg de HA se añaden 0,5 μl de BDDE. El proceso de reacción dura 16 h y eventualmente puede repetirse. El BDDE que no ha reaccionado se elimina por medio de diafiltración frente a agua. La muestra puede concentrarse entonces hasta la concentración deseada y se liofiliza a -20°C .

10

Bioactivación de HA con péptido (ácido aminohexanoico)3-ciclo(RGDfK)

- El péptido que está constituido por cinco aminoácidos y una subestructura molecular de ácido aminohexanoico que se repite tres veces se prepara según la síntesis de péptidos en fase sólida convencional según Merrifield. El péptido se une covalentemente a los grupos aldehídos reactivos preparados anteriormente del HA. El HA ya reticulado (2 mg) se hidrata en una disolución de acetato de sodio 100 mM ($\text{pH}=5,6$). A esto se añaden una disolución de peryodato de sodio 500 mM, el péptido (20 mg/ml en tampón acetato de sodio) y una disolución de cianoborohidruro de sodio 50 mM. El volumen de reacción asciende a 2 ml en 2 mg de HA reticulado. La reacción transcurre durante 4 h a TA. A continuación se lava 5 veces con una disolución salina con un valor de pH bajo (ácido acético al 1% / NaCl 1 M) para disolver el péptido unido iónicamente. Después se lava con agua destilada y se liofiliza.

20

B) Inmovilización de ácido hialurónico biotinilado con fibronectina sobre estreptavidina

Pretratamiento:

25

Antes de la modificación con el correspondiente polímero se desengrasa la capa de dióxido de titanio con un disolvente orgánico (acetona, etanol), a continuación se lava con agua y se seca con un flujo de nitrógeno. El revestimiento se realiza por medio de revestimiento por centrifugación o por inmersión. La capa debe tener un espesor entre 1 μm y 500 μm .

30

Biotinilación de ácido hialurónico

- Se disuelve hialuronato de sodio (500 mg, 1,25 mmol) en agua (50 ml). Se añaden EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (74,3 mg, 0,623 mmol) y sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) (134 mg, 0,623 mmol) como sólido a la disolución de HA y se disuelven. Sólo después de esto se añade AAD (dihidrazida del ácido adipico) (6,5 g, 37,5 mmol). La reacción transcurre durante 16 h con agitación a TA. Tras la finalización de la reacción se purifica HA-AAD por medio de diálisis (frente a NaCl 150 mM). Entonces se liofiliza el producto. Se incluye biotina en forma de sulfo-NHS-LC-biotina (hexanoato de sulfosuccinimidil-6-(biotinamido)) en el HA-AAD. Se añaden 100 mg de sulfo-NHS-LC-biotina a una disolución de HAAAD (300 mg, 3 mg/ml en tampón PBS). La reacción transcurre durante 16 h con agitación a TA. A continuación se purifica por medio de diálisis frente a agua durante 24 h. El producto purificado se liofiliza y se almacena a 4°C .

40

Reticulación del HA biotinilado

- 45 Se añade y se agita 1,4-butanodiol-diglicidiléter (BDDE) (enlace teóricamente al 100%: 2 mol de BDDE por 1 mol de HA) a HA-biotina (3% p/v en NaOH 0,1 N). La reacción se termina tras 45 min a una temperatura de 60°C . Después se neutraliza con ácido acético (70 μl). El gel puede verterse a continuación sobre un disco y puede secarse durante 2-3 días.

Inmovilización en estreptavidina del gel de HA biotinilado

- El HA biotinilado seco se hidrata en una disolución de estreptavidina (1 mM en tampón PBS) durante aproximadamente 1 h. A continuación se lava el gel tres veces con tampón PBS para eliminar estreptavidina unida de manera inespecífica. El almacenamiento se realiza de manera hidratada en tampón PBS a 4°C .

55

Inmovilización en fibronectina del gel de estreptavidina-HA

- El gel de estreptavidina-HA hidratado se calienta hasta TA y el tampón de PBS que sobrenada se retira con una jeringa. Se aplica una disolución de fibronectina 5×10^{-8} molar (ya biotinilada; grado de biotinilación = 10) en un tampón PBS. La disolución (2 ml) se añade al gel de estreptavidina-HA. El tiempo de incubación no debe quedar por debajo de 200 minutos. Tras la incubación se lava tres veces con tampón PBS. El almacenamiento se realiza de manera hidratada en tampón PBS a 4°C .

60

C) Inmovilización de un gel de HA-colágeno reticulado sobre titanio

Pretratamiento:

- 5 Antes de la modificación con el correspondiente polímero se desengrasa la capa de dióxido de titanio con un disolvente orgánico (acetona, etanol), a continuación se lava con agua y se seca con un flujo de nitrógeno. El revestimiento se realiza por medio de revestimiento por centrifugación o por inmersión. La capa debe tener un espesor entre 1 μm y 500 μm .

10 Síntesis de un gel de HA-colágeno reticulado

- Se añade y se agita 1,4-butanodiol-diglicidiléter (BDDE) (enlace teóricamente al 100%: 2 mol de BDDE por 1 mol de HA) a HA (3% p/v en NaOH 0,1 N). Después se neutraliza con ácido acético (70 μl). A continuación se añade y se mezcla colágeno en una concentración de 1 mg/ml. A continuación se seca el HA reticulado modificado durante 2-3 días a temperatura ambiente.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Implante médico que comprende un núcleo, al menos un ligador L_1 , al menos un componente de biotina B_1 , al menos un componente de unión a biotina, al menos un componente de biotina B_2 y al menos una biomolécula, donde
- el ligador L_1 comprende un extremo proximal y un extremo distal, con el extremo proximal está unido covalentemente al núcleo y con el extremo distal está unido covalentemente al componente de biotina B_1 , donde entre la unión del ligador L_1 al núcleo y la unión del ligador L_1 al componente de biotina B_1 existen uniones covalentes de manera continua;
 - el componente de biotina B_2 está unido covalentemente con la biomolécula; y
 - el componente de unión a biotina presenta al menos un sitio de unión S_1 para el componente de biotina B_1 , al que está unido el componente de biotina B_1 no covalentemente, y presenta al menos un sitio de unión S_2 para el componente de biotina B_2 , al que está unido el componente de biotina B_2 no covalentemente;
- donde la biomolécula se selecciona del grupo que está constituido por biopolímeros, péptidos y sacáridos.
2. Implante según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el componente de biotina B_1 está unido al sitio de unión S_1 del componente de unión a biotina y/o el componente de biotina B_2 está unido al sitio de unión S_2 del componente de unión a biotina a través de una interacción no covalente con una constante de asociación de al menos $10^8 M^{-1}$.
3. Implante según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** el componente de unión a biotina se selecciona del grupo que está constituido por componentes de avidina, neutravidina y estreptavidina.
4. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dos componentes de biotina B_1 están unidos a dos sitios de unión S_1 de un componente de unión a biotina individual.
5. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la biomolécula comprende dos componentes de biotina B_2 respectivamente unidos covalentemente, que están unidos respectivamente no covalentemente a componentes de unión a biotina.
6. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** comprende una multiplicidad de componentes de biotina B_1 y una multiplicidad de componentes de unión a biotina con sitios de unión S_1 y S_2 , donde los componentes de biotina B_1 están unidos respectivamente a través del ligador L_1 covalentemente al núcleo y al menos una proporción de los componentes de biotina B_1 está unida no covalentemente a sitios de unión S_1 de componentes de unión a biotina iguales o distintos.
7. Implante según la reivindicación 6, **caracterizado por que** comprende al menos una zona, en la que la concentración de superficie de la totalidad de todos los componentes de biotina B_1 se encuentra en el intervalo de 1 - 2 componentes de biotina B_1 por 24 nm^2 .
8. Implante según la reivindicación 6 o 7, **caracterizado por que** la proporción molar relativa de componentes de unión a biotina con respecto a componentes de biotina B_1 se encuentra en el intervalo de 1 : 2 a 1 : 4.
9. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el componente de biotina comprende un espaciador, que está unido covalentemente al extremo distal del ligador L_1 .
10. Implante según la reivindicación 9, **caracterizado por que** éste
- contiene ligadores L_1 del tipo L_1' que no están unidos a componentes de biotina B_1 y
 - contiene ligadores L_1 del tipo L_1'' que están unidos covalentemente a componentes de biotina B_1 , donde la distancia promedio de los extremos distales de los ligadores L_1'' al átomo de azufre de los componentes de biotina B_1 asciende a 1,6 nm.
11. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** comprende distintas zonas de superficie con una superficie mínima de respectivamente $1,0 \text{ nm}^2$, en la que están unidas distintas biomoléculas o distintas mezclas de distintas biomoléculas.
12. Implante según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el extremo proximal del ligador L_1 está unido al núcleo a través al menos de un átomo de Si o P.
13. Implante según la reivindicación 12, **caracterizado por que** el átomo de Si o P es parte de un grupo funcional seleccionado de silanos, siloxanos, fosfatos, fosfonatos y fosforanos.

14. Uso de una biomolécula para la fabricación de un implante según una de las reivindicaciones 1 a 13 para el tratamiento de daños dentales.

Figura 1

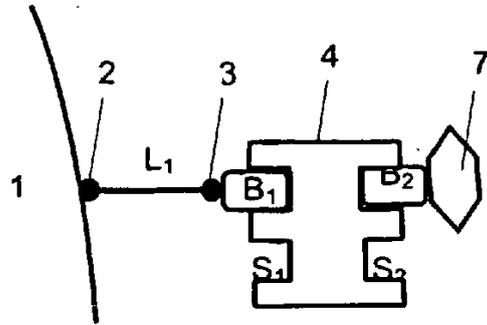


Figura 2

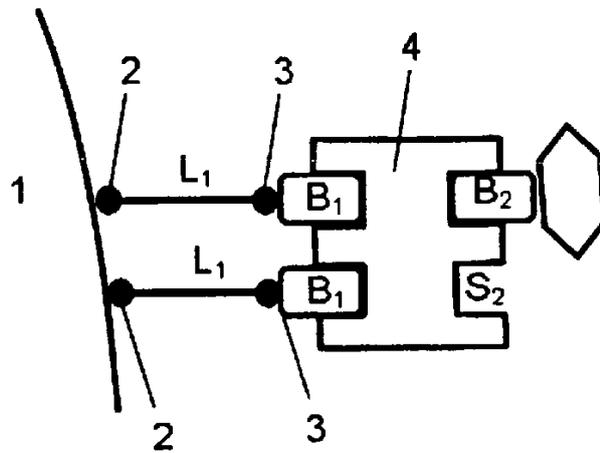


Figura 3

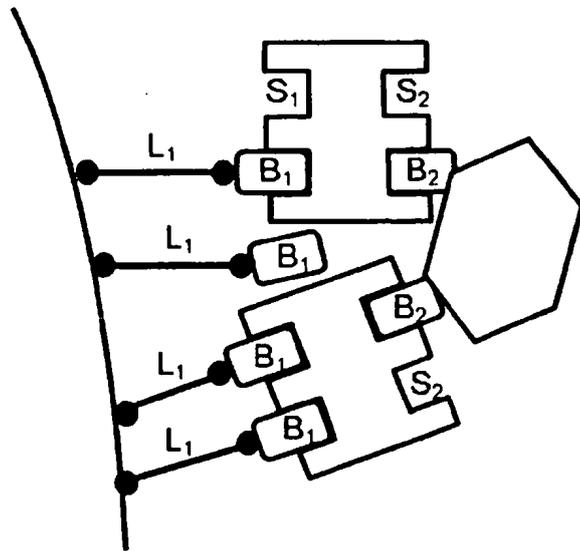


Figura 4-A

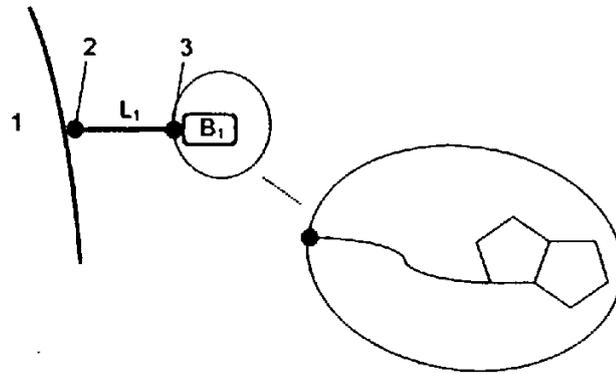


Figura 4-B

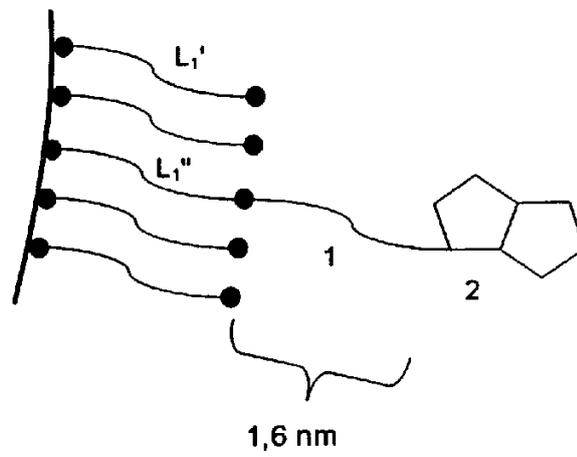
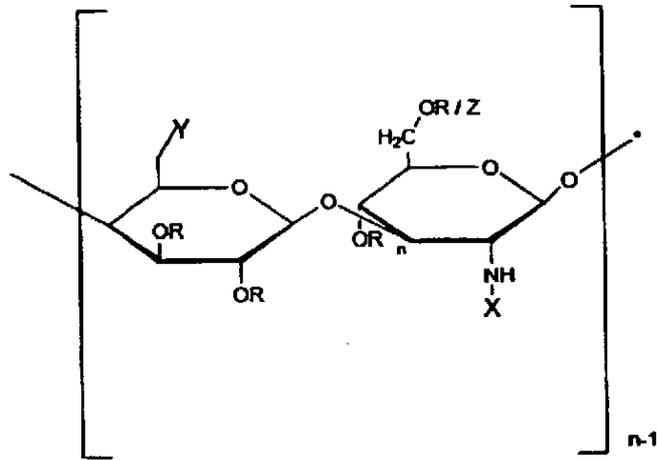


Figura 5



X= -H, -COCH₃, -NHCONH-péptido,

Y= -COOH,

-COOR,

-CONH-péptido,

-ADD-sulfo-NHS-LC-biotina,

-ADD-sulfo-NHS-LC-biotina-estreptavidina,

-ADD-sulfo-NHS-LC-biotina-estreptavidina-biotinaFN

Z= -H,

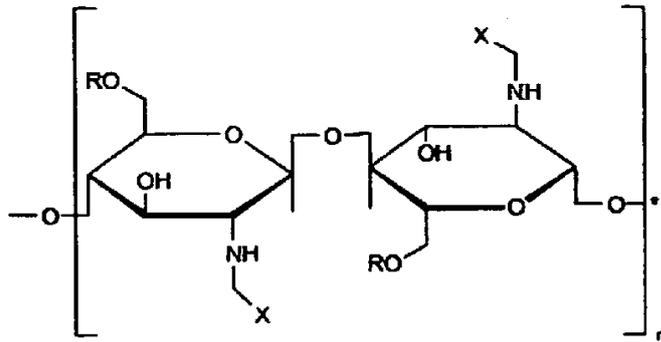
Moléculas reticulantes,

R= -H,

Moléculas reticulantes

-CONH-péptido

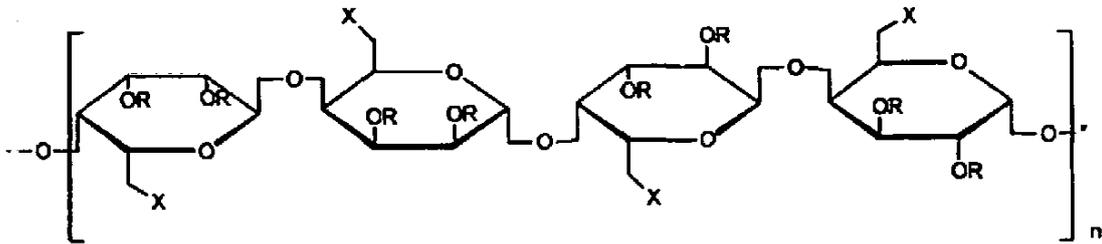
Figura 6



X= -H, -COCH₃,
 -NHCONH-péptido,

R= -H,
 .Moléculas reticulantes
 -CONH-péptido

Figura 7



X= -H,

Moléculas reticulantes

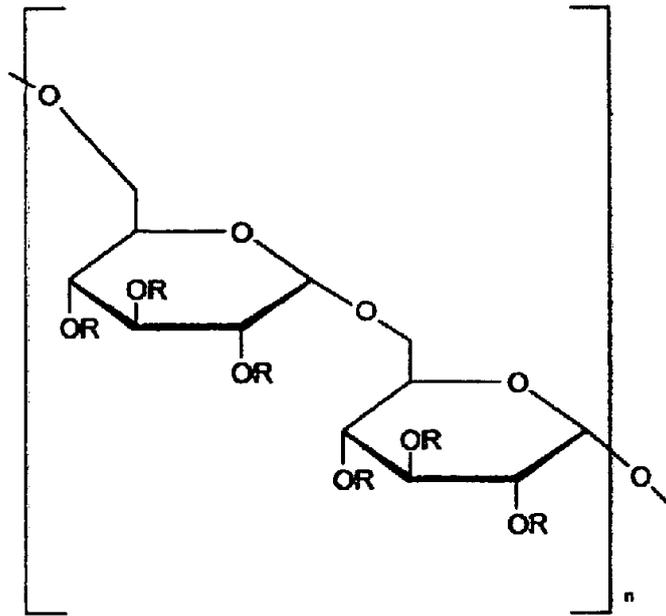
.-CONH-péptido

R= -H,

Moléculas reticulantes,

.-CONH-péptido

Figura 8



R= Dextrano = -H,

-Moléculas reticulantes

-CONH-péptido

Figura 9

