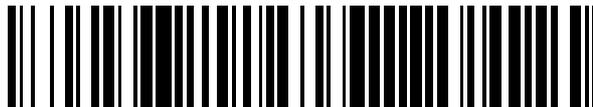


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 377**

51 Int. Cl.:

**C25D 11/26** (2006.01)

**A61L 27/04** (2006.01)

**A61L 27/06** (2006.01)

**A61L 27/32** (2006.01)

**A61F 2/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2009 E 12164428 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2479318**

54 Título: **Sustratos de metal modificados con tratamiento biomimético a base de silicio para la osteointegración de los mismos**

30 Prioridad:

**29.07.2008 IT MI20081399**

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

**11.02.2014**

73 Titular/es:

**POLITECNICO DI MILANO (100.0%)  
Piazza Leonardo da Vinci, 32  
20133 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**CHIESA, ROBERTO;  
CIGADA, ALBERTO;  
DELLA VALLE, CINZIA;  
RONDELLI, GIANNI;  
CANDIANI, GABRIELE y  
GIORDANO, CARMEN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 442 377 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**

Sustratos de metal modificados con tratamiento biomimético a base de silicio para la osteointegración de los mismos

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a la modificación de la superficie de titanio, tántalo y las respectivas aleaciones por medio de un tratamiento electroquímico de oxidación anódica. Este método es útil en particular para la modificación de la superficie de prótesis e implantes.

**Técnica anterior**

10 En el campo de la prostodoncia y las prótesis articulares ortopédicas se ha encontrado que la compatibilidad de los materiales usados para prótesis con tejidos biológicos es fundamentalmente importante para permitir el tratamiento adecuado de los pacientes.

Los materiales usados comúnmente en estos campos consisten sustancialmente en sustratos metálicos de acero, titanio o tántalo, que presentan excelentes propiedades mecánicas pero requieren largos tiempos para integración en los tejidos biológicos de los pacientes en que se implantan y para la curación de la región de la implantación.

15 Para obviar estas desventajas, se han desarrollado métodos que son adecuados para modificar la superficie de los sustratos metálicos por introducción en ella de grupos químicos o elementos químicos capaces de interactuar con tejidos biológicos y permitiendo así la integración entre la prótesis y los tejidos. Estos métodos se conocen generalmente como tratamientos biomiméticos.

20 Por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.385.662 con el nombre de Kurze et al. describe la modificación de superficies metálicas por medio de un tratamiento de peróxido de hidrógeno para depositar una capa de óxidos metálicos sobre dichas superficies. Este método, sin embargo, no se describe para uso en el campo biomédico.

La Patente de EE.UU. 5.152.993 con el nombre de Lars-Magnus et al. y la Patente de EE.UU. 5.885.612 con el nombre de Ohthuki et al. describen el tratamiento de superficies metálicas usando peróxido de hidrógeno y opcionalmente iones metálicos, para modificar las superficies de prótesis metálicas por introducción de grupos hidroxilo (-OH) en las mismas.

25 La Patente Europea EP0678300 con el nombre de Kokubo, por otra parte, describe el tratamiento de superficies metálicas por inmersión en una disolución alcalina de NaOH, seguido por lavado y tratamiento térmico a alta temperatura. Este método, también, introduce grupos -OH, que son adecuados para interacción con tejidos óseos, en la superficie metálica tratada.

30 Por otra parte, la Patente de EE.UU. 5.478.237 con el nombre de Ishizawa et al. describe el uso de deposición anódica sobre la superficie de implantes óseos, con el objeto de modificar la composición y la morfología del sustrato metálico. Aunque no se describe la introducción de grupos -OH, el procedimiento de la Patente de EE.UU. 5.478.237 conduce a la formación de una capa porosa que es rica en calcio y fósforo sobre la superficie de los implantes, que facilita su osteointegración.

35 Finalmente, la Patente Europea EP1515759 con el nombre de Politecnico di Milano explica el uso de una doble etapa de deposición anódica para depositar sobre la superficie de implantes metálicos una capa microporosa de calcio y fósforo, introduciendo al mismo tiempo grupos -OH.

A pesar de estas tecnologías, hay sin embargo la necesidad de proporcionar nuevos métodos capaces de facilitar la integración de sustratos metálicos en tejidos biológicos que sean más eficaces y más simples de realizar.

**Sumario de la invención**

40 El principal objetivo de la presente invención es proporcionar sustratos metálicos modificados con un tratamiento biomimético.

Dentro del alcance de este objetivo, un objeto de la invención es un sustrato metálico modificado en la superficie con grupos químicos funcionales y elementos químicos específicos, que pueda facilitar la integración en tejidos biológicos.

45 Otro objeto de la invención es el uso de dicho sustrato para preparar prostodoncia y prótesis articulares ortopédicas.

Este objetivo y estos y otros objetos, que llegarán a ser más evidentes de ahora en adelante, se consiguen por los sustratos de metal modificados en la superficie y su uso según las reivindicaciones adjuntas. Los sustratos de metal modificados superficialmente se seleccionan de los que pertenecen al grupo que consiste en: titanio, tántalo, aleaciones de titanio y aleaciones de tántalo y se preparan con el método como se desvela y se reivindica en la solicitud principal con la Patente Europea Número de publicación EP2307594 (fase regional Europea de la Patente Internacional WO 2010013120) que comprende en particular las etapas:

50

(a) someter el sustrato de metal a un tratamiento de deposición por chispas anódicas (ASD, por sus siglas en inglés) en una disolución acuosa que comprende silicato de sodio hidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), acetato de calcio hidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido de sodio (NaOH) y

5 (b) sumergir el sustrato de metal sometido al tratamiento de deposición anódica ASD en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH).

### Breve descripción de los dibujos

Más características y ventajas de la invención llegarán a ser más evidentes a partir de la descripción detallada del método según la invención y a partir de los dibujos adjuntos, en los que:

10 La Figura 1A es una micrografía SEM de una muestra de titanio de la invención sometida a tratamiento ASD según el método reivindicado en la solicitud principal ya mencionada, previamente a inmersión en NaOH;

La Figura 1B es el espectro obtenido siguiendo microanálisis EDS de una muestra de titanio de la invención preparada con tratamiento ASD según el método reivindicado en la solicitud principal ya mencionada, previamente a inmersión en NaOH;

15 La Figura 2A es una micrografía SEM de una muestra de titanio de la invención preparada según el método desvelado en lo ya mencionado y reivindicado en la solicitud principal ya mencionada.

La Figura 2B es el espectro obtenido siguiendo microanálisis EDS de una muestra de titanio de la invención preparada según el método reivindicado en la solicitud principal ya mencionada.

20 La Figura 3A es un cuadro de la cantidad de calcio ( $\mu\text{g}$  de  $\text{Ca}/\text{cm}^2$  de la muestra) que está presente en las muestras sometidas a tratamiento ASD según el método desvelado y reivindicado en la solicitud principal ya mencionada, antes de (SUMNa no NaOH) y después de (SUMNa) inmersión en NaOH y la muestra de referencia (BS);

La Figura 3B es un cuadro de la cantidad de fósforo ( $\mu\text{g}$  de  $\text{P}/\text{cm}^2$  de la muestra) que está presente en las muestras sometidas a tratamiento ASD según el método reivindicado en la solicitud principal, antes de (SUMNa no NaOH) y después de (SUMNa) inmersión en NaOH y en la muestra de referencia (BS);

25 La Figura 4A es un difractograma XRD de una muestra de la invención preparada según el método reivindicado en la solicitud principal (SUMNa);

La Figura 4B es un difractograma XRD de una muestra de referencia (BS);

La Figura 5A es un cuadro de los resultados del análisis del perfil para el parámetro  $R_a$  (datos expresados como la media  $\pm$  desviación estándar) de la muestra de la invención preparada según el método reivindicado en la solicitud principal ya mencionada (SUMNa) y las muestras de referencia (Ti y BS);

30 La Figura 5B es un cuadro de los resultados del análisis del perfil para el parámetro  $R_t$  (datos expresados como la media  $\pm$  desviación estándar) de una muestra de la invención preparada según el método reivindicado en la solicitud principal (SUMNa) y las muestras de referencia (Ti y BS);

35 La Figura 5C es un cuadro de los resultados del análisis del perfil para el parámetro  $R_{\text{máx}}$  (datos expresados como la media  $\pm$  desviación estándar) de una muestra de la invención preparada según el método reivindicado en la solicitud principal (SUMNa) y las muestras de referencia (Ti y BS);

La Figura 5D es una tabla que resume los valores medios de los parámetros  $R_a$ ,  $R_t$  y  $R_{\text{máx}}$  obtenidos del análisis del perfil de las muestras;

40 La Figura 6 es un cuadro de los resultados del ensayo de microdureza de Vickers para muestras preparadas con el método reivindicado en la solicitud principal siguiendo a tratamiento ASD según antes de (SUMNa wo NaOH) y después de (SUMNa) inmersión en NaOH y para las muestras de referencia (Ti y BS);

La Figura 7A es una micrografía SEM de una muestra de titanio según la invención preparada con el método reivindicado en la solicitud principal después del ensayo de flexión a  $15^\circ$  al plano de anclaje;

La Figura 7B es una micrografía SEM de una muestra de titanio de la invención preparada según el método reivindicado en la solicitud principal después del ensayo de flexión a  $45^\circ$  al plano de anclaje;

45 La Figura 8A es una micrografía SEM de una muestra de referencia de titanio (Ti) después de 14 días de inmersión en SBF;

La Figura 8B es un espectro obtenido después de microanálisis EDS de una muestra de referencia de titanio (Ti) después de 14 días de inmersión en SBF;

La Figura 8C es una micrografía SEM de una muestra de referencia de titanio (BS) después de 14 días de inmersión en SBF;

La Figura 8D es un espectro obtenido después de microanálisis EDS de una muestra de referencia de titanio (BS) después de 14 días de inmersión en SBF;

- 5 La Figura 8E es una micrografía SEM de una muestra de titanio de la invención preparada según el método reivindicado en la solicitud principal después de 14 días de inmersión en SBF;

La Figura 8F es un espectro obtenido después de microanálisis EDS de una muestra de titanio de la invención preparada con el método de la solicitud principal después de 14 días de inmersión en SBF;

La Figura 9A es un difractograma XRD de una muestra de referencia (Ti) después de 14 días de inmersión en SBF;

- 10 La Figura 9B es un difractograma XRD de una muestra de referencia (BS) después de 14 días de inmersión en SBF;

La Figura 9C es un difractograma XRD de una muestra de la invención preparada según el método desvelado en la solicitud principal (SUMNa) después de 14 días de inmersión en SBF;

La Figura 10A es una metalografía óptica de una muestra de referencia (Ti) después de 14 días de inmersión en SBF;

- 15 La Figura 10B es una metalografía óptica de una muestra de referencia (BS) después de 14 días de inmersión en SBF;

La Figura 10C es una metalografía óptica de una muestra de la invención preparada con el método reivindicado en la solicitud principal (SUMNa) después de 14 días de inmersión en SBF;

- 20 La Figura 11 muestra los resultados del ensayo de Azul Alamar después de 7 días de cultivo de células MG63 en muestras sometidas a tratamiento ASD según el método reivindicado en la solicitud principal antes de (SUMNa wo NaOH) y después de (SUMNa) inmersión en NaOH y en las muestras de referencia (Ti y BS); los datos, indicados como unidades arbitrarias (las ABU, por sus siglas en inglés), proceden de la media de tres diferentes cultivos para cada muestra  $\pm$  desviación estándar;

- 25 La Figura 12A es una micrografía SEM de una muestra de referencia (Ti) después de 7 días de cultivo de células MG63;

La Figura 12B es una micrografía SEM de una muestra de referencia (BS) después de 7 días de cultivo de células MG63;

La Figura 12C es una micrografía SEM de una muestra de la invención preparada según el método reivindicado en la solicitud principal (SUMNa) después de 7 días de cultivo de células MG63;

- 30 La Figura 13 es un cuadro del contenido en CICIP (secuencia de colágeno C-terminal de tipo 1) en las muestras sometidas a tratamiento ASD según el método reivindicado en la solicitud principal antes de (SUMNa wo NaOH) y después de (SUMNa) inmersión en NaOH y en las muestras de referencia (Ti y BS) después de 7 días de cultivo de células MG63; los datos se indican como valores medios en cuatro muestras  $\pm$  desviación estándar;

- 35 La Figura 14 es un cuadro de la deposición de osteocalcina después de 7 días de cultivo de células MG63 en las muestras sometidas a tratamiento ASD según el método reivindicado en la solicitud principal antes de (SUMNa wo NaOH) y después de (SUMNa) inmersión en NaOH y en las muestras de referencia (Ti y BS); los datos se indican como valores medios en cuatro muestras  $\pm$  desviación estándar;

- 40 La Figura 15 es un cuadro de la relación entre absorción de fibronectina y albúmina de suero en las muestras sometidas a tratamiento ASD según el método reivindicado en la solicitud principal antes de (SUMNa wo NaOH) y después de (SUMNa) inmersión en NaOH y en las muestras de referencia (Ti y BS); los datos, indicados como unidades arbitrarias (las ABU), proceden de la media de cuatro muestras  $\pm$  desviación estándar.

### **Modos de llevar a cabo la invención**

- 45 Para proporcionar los sustratos metálicos con que se hagan prótesis e implantes con mejores propiedades de integración en tejidos biológicos, estos sustratos se modifican por medio de tratamientos biomiméticos, que llevan a una modificación morfológica y química de la superficie de los sustratos metálicos por medio de una serie de pasos del método descrito en la Solicitud principal.

- 50 El primer paso de este método (etapa (a)) proporciona uso de la técnica de deposición por chispas anódicas (ASD), una técnica para pasivación anódica de metales debido a que es posible depositar en la superficie metálica una capa de óxido metálico. Junto con la técnica de ASD, se usa una disolución acuosa de agentes químicos con que se modifica la superficie de los sustratos de metal, seleccionándose el metal del grupo que consiste en titanio (Ti),

tántalo (Ta), aleaciones de titanio y aleaciones de tántalo. Preferiblemente, el sustrato de metal puede ser titanio.

En particular, durante la etapa (a) se somete un sustrato de metal a tratamiento ASD en una disolución acuosa de deposición que comprende silicato de sodio hidratado ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $\beta$ -glicerofosfato ( $\beta$ -GP), acetato de calcio hidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e hidróxido de sodio (NaOH).

5 En una realización del procedimiento reivindicado en la solicitud principal, la disolución acuosa de deposición puede comprender silicato de sodio hidratado a una concentración de 0,005 M a 0,1 M, preferiblemente 0,03 M,  $\beta$ -glicerofosfato a una concentración de 0,03 M a 0,2 M, preferiblemente 0,1 M, acetato de calcio hidratado a una concentración de 0,05 M a 0,6 M, preferiblemente 0,3 M y NaOH a una concentración de 0,005 M a 0,4 M, preferiblemente 0,036.

10 Preferiblemente, la etapa del tratamiento ASD se realiza a una temperatura comprendida en un intervalo de  $0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

En otra realización, la etapa del tratamiento ASD se realiza preferiblemente trabajando a un primer valor de la densidad de corriente de 5 a  $50 \text{ mA/cm}^2$ , preferiblemente  $10 \text{ mA/cm}^2$ , con un potencial que aumenta libremente hasta un valor de 210 a 310 V, preferiblemente 300 V, durante un periodo de tiempo necesario para alcanzar dicho valor del potencial y un segundo valor de la densidad de corriente de 50% a 5%, preferiblemente 20%, de dicho primer valor de la densidad de corriente.

15 La segunda fase del método anterior (etapa (b)) consiste en sumergir el sustrato de metal sometido al tratamiento de deposición anódica ASD en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH). Esta inmersión conduce a un ataque químico producido por la disolución alcalina sobre la superficie del metal, debido a que es posible optimizar la relación cuantitativa entre los elementos químicos depositados durante la etapa (a) e introduce grupos -OH en la superficie del sustrato de metal.

20 Preferiblemente, la inmersión del sustrato en la disolución de NaOH después de deposición anódica ASD se puede realizar a una temperatura de  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  durante un periodo de tiempo de 0,25 a 6 horas, más preferiblemente 2 horas. Por otra parte, la disolución de NaOH usada puede tener una concentración de 0,5 a 10 M, preferiblemente 5 M, de NaOH.

25 En otra realización, el método desvelado en la solicitud principal puede comprender además una etapa de limpieza del sustrato de metal antes de la etapa de deposición anódica ASD, sumergiendo el sustrato en una bandeja de ultrasonidos que contiene acetona durante un primer periodo de tiempo de 3 a 5 minutos y agua destilada durante un segundo periodo de tiempo de 3 a 5 minutos.

30 Esta etapa de limpieza es útil para retirar cualquier impureza en la superficie del sustrato de metal antes de realizar el tratamiento ASD.

Además, en otra realización, el método reivindicado en la solicitud principal puede comprender además, independientemente entre sí, las etapas de limpieza del sustrato de metal por inmersión en agua destilada después del tratamiento de deposición anódica y/o después de la inmersión del sustrato en la disolución de NaOH.

35 La etapa de limpieza además en agua destilada después del tratamiento ASD y/o después de inmersión en la disolución de NaOH es útil para retirar de la superficie del sustrato cualquier residuo contaminante.

40 Realizando las etapas (a) y (b) del método reivindicado en la solicitud principal es posible por lo tanto obtener, en solo dos etapas, la deposición sobre la superficie del sustrato de metal de una capa de óxido de metal enriquecida con calcio (Ca), fósforo (P), silicio (Si) y sodio (Na) con una morfología adherente, resistente, microporosa y al mismo tiempo se caracteriza por la presencia de grupos químicos -OH, proporcionando así el sustrato con considerables propiedades biomiméticas.

Preferiblemente, la disolución acuosa de deposición usada en el método desvelado y reivindicado en la solicitud principal puede comprender  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a una concentración de 0,005 M a 0,1 M, preferiblemente 0,03 M,  $\beta$ -GP a una concentración de 0,03 M a 0,2 M, preferiblemente 0,1 M,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a una concentración de 0,05 M a 0,6 M, preferiblemente 0,3 M y NaOH a una concentración de 0,005 M a 0,4 M, preferiblemente 0,036 M.

45 Ventajosamente, esta disolución de deposición hace posible introducir en la superficie de sustratos metálicos sometidos a tratamiento anódico ASD elementos químicos que sean adecuados para aumentar las propiedades biomiméticas del sustrato metálico modificado en la superficie de la invención sin recurrir a múltiples ciclos de deposición anódica.

### Ejemplo

50 Se sometieron muestras de titanio metálicas al método desvelado en la solicitud principal según el siguiente procedimiento:

1. limpieza de la superficie de las muestras de titanio CP de grado 2, usando una bandeja de ultrasonidos, durante 3-

5 minutos en acetona y 3-5 minutos en agua destilada;

2. tratamiento ASD en disolución acuosa de  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,03 M,  $\beta$ -GP 0,1 M,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,3 M y NaOH 0,036 M; la disolución se mantiene a aproximadamente  $0^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ , densidad de corriente de  $10 \text{ mA/cm}^2$ , potencial libre para subir a 300 V; el tratamiento ASD finaliza cuando el valor del potencial alcanza 300 V y la densidad de corriente cae a 20% del valor fijado;

3. lavado en agua destilada;

4. tratamiento de ataque químico con una disolución alcalina 5 M de NaOH a una temperatura de  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2 horas,

5. lavado en agua destilada y secado.

10 Las muestras obtenidas por medio del procedimiento descrito aquí, referido de ahora en adelante como muestras SUMNa, se compararon después con dos series distintas de muestras de comparación. La primera serie de muestras de comparación consiste en muestras de titanio no tratado, limpiado simplemente usando una bandeja de ultrasonidos, durante 3-5 minutos en acetona y 3-5 minutos en agua destilada, referido de ahora en adelante como muestras de Ti. La segunda serie de muestras de comparación se obtiene por medio de un procedimiento en tres  
15 pasos, que consiste en: tratamiento ASD en una disolución 0,015 M de glicerolfosfato de calcio ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{CaO}_6\text{P}$ ) a una densidad de corriente de  $7 \text{ mA/cm}^2$  hasta un voltaje máximo de 350 V; segundo tratamiento ASD en una disolución 0,1 M de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a una densidad de corriente de  $7 \text{ mA/cm}^2$  y a un voltaje máximo de 370 V; post-tratamiento térmico/químico en KOH 5 M a  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Las muestras de comparación de la segunda serie se refieren de ahora en adelante como muestras BS.

20 Las muestras de la invención y las muestras de comparación se han examinado y caracterizado por medio de los siguientes procedimientos experimentales:

- Microscopía de barrido electrónico (SEM, por sus siglas en inglés): análisis de morfología de superficie (ZEISS-EVO 50 EP y Cambridge - Stereoscan 360). Para la observación de las células cultivadas en las muestras, la superficie de cada muestra se recubrió con oro (Edwards, Sputter Coater S150B) y se realizó la observación en  
25 condiciones de alto vacío ( $1 \times 10^{-5} \text{ mm}$  de Hg).

- Espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDS, por sus siglas en inglés): se realizó microanálisis (Oxford, Inca Energy 200) sobre aumentos x500 en una porción de muestra de tamaño micrométrico.

- Perfilometría láser: se sometieron las muestras a 3 mediciones de rugosidad superficial realizadas con un perfilómetro láser (UBM Microfocus, modelo 5600).

30 - Difractometría de rayos X de película delgada (TF-XRD): se analizó la estructura de las películas por medio de un difractómetro (Philips PW 3710) con ánodo de cobre, ajustando 40 mA de corriente y un voltaje de 40 kV. La configuración de película delgada se usó para las presentes investigaciones.

35 - Espectroscopía de emisión óptica de plasma (ICP-OES): se realizó un análisis de composición cuantitativa en cada muestra individual después de ataque químico con 5 ml de ácido sulfúrico al 96% a  $60^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Se realizó análisis espectroscópico de emisión de plasma en la muestra resultante después de dilución a 50 ml.

- Análisis de microdureza Vickers: se realizaron ensayos de microdureza por medio de un microdurómetro (Leitz, Wetzlar, Alemania) al tiempo que se aplicaba una carga de 50 g a la superficie.

40 - Análisis de adherencia de óxido: se doblaron muestras rectangulares de titanio anodizado (30 x 70 mm) a  $15^\circ$  y  $45^\circ$ . Se realizó un análisis con un microscopio electrónico en la superficie curvada para evaluar el daño a la película superficial.

- Metalografía óptica: se realizaron análisis metalográficos en las muestras después de 14 días de incubación en disolución tipo SBF de Kokubo, para evaluar el espesor del depósito de cualquier fosfato de calcio que podía estar presente.

45 - Ensayos in vitro (para evaluar la bioactividad del tratamiento): se sumergieron las muestras tratadas en una disolución de SBF (Fluido Corporal Simulado) adecuada para evaluar el crecimiento y recubrimiento de fosfatos de calcio presentes en la disolución. La presencia y extensión de dichos recubrimientos se considera un indicador significativo de bioactividad del tratamiento y del potencial como un tratamiento biomimético para osteointegración. La disolución de SBF usada presenta la siguiente composición (ideada por Kokubo) por litro de disolución: 8 g de NaCl, 0,353 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,224 g de KCl, 0,231 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0,311 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,368 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,071 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Al final, se añadieron 6,057 g de tris-(hidroximetil)-aminometano ( $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ )tris) y finalmente se ajustó el pH a 7,40 añadiendo HCl. Cada muestra se puso en un pozo de una  
50 placa de múltiples pozos y se cubrió con 12 ml de disolución de SBF. Las placas, selladas con Parafilm, se pusieron en una estufa a la temperatura constante de  $36,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$  durante 1, 5, 7, 11 y 14 días. Cada 24 horas, se reemplazó

la disolución con nueva disolución, precalentada a 37°C. La morfología superficial de las muestras se analizó por SEM para determinar la extensión de cualquier depósito de fosfato de calcio.

Los ensayos celulares in vitro usaron células MG63 (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, ECACC) cultivados con Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM) (M2279, Sigma) que contenían 10% (p/p) de suero fetal bovino (FBS) (Sigma), 1% (p/p) de aminoácidos no esenciales (NEAA) (Sigma), 2 mM de glutamina (Sigma), 100 unidades/ml de penicilina (Sigma) y 0,1 mg/ml de estreptomycin (Sigma) en una incubadora (ThermoForma, mod3111) a 37°C, humedad relativa de 95% y 5% p/p de CO<sub>2</sub>.

- Esterilización: las muestras se esterilizaron por exposición a luz ultravioleta después de pasar por etanol al 70%.

- Siembra de células: se dispensaron 50 µl (1x10<sup>4</sup> células) de la suspensión celular obtenida previamente en cada muestra con una micropipeta.

- Extracción de sobrenadantes y lisados de células: para cada intervalo de tiempo, se tomó el sobrenadante de cada muestra y después se crioconservó a -80°C. Después de lavado en PBS, se extrajeron las proteínas intracelulares y extracelulares de las muestras. La centrifugación a 209 rad/s (2.000 rpm) durante 5 minutos proporcionó el lisado celular, que se crioconservó con posterioridad a -80°C.

- Análisis de citotoxicidad directo (ensayo Alamar): en condiciones estériles, para cada intervalo de tiempo 1, 3 y 7 días, el medio de cultivo se reemplazó con 500 µl de disolución Alamar (Azul Alamar al 10% (p/p) en EMEM), que se dejó incubar durante 4 horas. Se dispensaron así 100 µl de sobrenadante que contenían Azul Alamar en una placa de múltiples pozos y se usó un espectrofotómetro (Tecan, modelo Genios Plus) para leer la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con longitud de onda de referencia a 630 nm.

- Determinación de contenido de proteína total: partiendo de los lisados de células resultantes, se cuantificó el contenido total de proteína presente en cada muestra por medio de un Estuche de Ensayo de Proteínas BCA™ (Pierce).

Colágeno I: se usó ELISA Estuche de EIA de C-ICP (Colágeno I C-Terminal) (Metra-Quidel) para determinar en el sobrenadante el nivel de péptido C-terminal liberado en cantidad estequiométrica con respecto a la producción de Colágeno I por las células en el medio de cultivo (sobrenadante) después de 1, 3 y 7 días de cultivo.

- Osteocalcina: el nivel de osteocalcina depositado por las células después de 1, 3 y 7 días de cultivo se determinó por medio de un ELISA Estuche de EIA de Osteocalcina de tipo - Gla (Zymed) en los respectivos lisados de células.

- Adsorción de proteínas en suero humano: las muestras se incubaron a 37°C con 300 µl de suero durante 2 horas. Después de lavado en PBS, se extrajeron las proteínas usando un tampón de extracción y un bisturí. La centrifugación a 209 rad/s (2.000 rpm) durante 5 minutos proporcionó el extracto de proteínas, crioconservado con posterioridad a -80°C.

- Determinación del contenido total de proteínas en suero: partiendo de los extractos de proteínas, se cuantificó el contenido de proteínas en suero adsorbidas en cada muestra mediante Estuche de Ensayo de Proteínas BCA™ (Pierce).

- Fibronectina: el nivel de fibronectina adsorbida en las superficies, después de incubación en suero humano, se investigó mediante un ESTUCHE ELISA DE FIBRONECTINA HUMANA QuantiMatrix™ (Chemicon) en los diversos extractos de proteínas.

- Albúmina: el nivel de albúmina adsorbida en las superficies, después de incubación en suero humano, se investigó por el Método Western. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de Acrilamida/Bisacrilamida al 10% (37,5/1) y después se transfirió a una membrana PVDF. Se realizó incubación con el anticuerpo primario (Albúmina de Suero Policlonal de Cabra a Humano - ab 19180; Abcam) y finalmente con el secundario (Ratón Anti Cabra AffinPure conjugado a Peroxidasa). La presencia de albúmina se detectó mediante una Estación de Imagen Kodak.

Los resultados de los procedimientos del análisis son como sigue.

El análisis de morfología de superficie por SEM mostró, para la superficie de las muestras SUMNa, tanto antes de (Figura 1A) como después de (Figura 2A) inmersión en NaOH, la presencia de poros micrométricos redondos; el aspecto de la superficie completa es uniforme. Antes de inmersión en NaOH (ataque químico), el análisis EDS destaca la presencia sobre la superficie de calcio, silicio y fósforo (Figura 1B), mientras la inmersión en NaOH hace posible aumentar la relación de calcio/fósforo y enriquecer la superficie con sodio (Figura 2B).

El análisis ICP/OES confirma lo que se encontró por microanálisis EDS. La Figura 3A de hecho hace posible ver que las cantidades de calcio y fósforo que están presentes en las muestras SUMNa son superiores a las presentes en la BS de control. También se puede observar que el ataque químico en NaOH aumenta la relación calcio/fósforo.

El análisis XRD destaca que el óxido de titanio que está presente en la superficie después del tratamiento de

SUMNa tiene la estructura cristalográfica de la anatasa, a un ángulo  $2\theta$  de  $25^\circ$  (Figura 4A). Esta característica se puede observar también en la BS de control, aunque es menos notable en la última (Figura 4B). Para la superficie SUMNa, se puede observar que el pico de la anatasa es mayor que el pico del titanio y por lo tanto en la superficie hay una capa espesa de óxido. Esto es un factor positivo, puesto que la anatasa presenta propiedades catalíticas importantes, que estimulan nucleación in vitro de cristal de hidroxiapatito, permitiendo una alta realización in vivo. Por otra parte, induce una disminución importante en la adhesión bacteriana sin comprometer la actividad de las células eucariotas.

La perfilometría láser mostró, para las muestras SUMNa, un incremento en la rugosidad ( $R_a$ ,  $R_{m\acute{a}x}$  y  $R_t$ ) con respecto a materiales de control (Figuras 5A, 5B y 5C). Se ha demostrado extensamente en la bibliografía que la rugosidad superficial de un material afecta al comportamiento de las células en términos de diferenciación y proliferación. El análisis perfilométrico muestra que las muestras SUMNa tienen una superficie nanorugosa.

El análisis de microdureza Vickers muestra que la superficie de las muestras preparadas según el método de la invención tiene una mayor dureza que las superficies de control (Figura 6). Este hallazgo sugirió una evaluación de si el recubrimiento producido era frágil y susceptible de deslaminación y se realizaron ensayos de adherencia de recubrimiento, por lo tanto, con flexión a  $15^\circ$  y  $45^\circ$  con respecto al plano de anclaje de la muestra. La Figura 7A muestra que la superficie presenta grietas pequeñas, que llegan a ser más notables después de flexión a  $45^\circ$  (Figura 7B). A pesar de la condición de flexión extrema aplicada, el recubrimiento permanece adhesivo a la superficie del titanio subyacente, sin presentar ninguna región deslaminada sin óxido.

Para establecer la bioactividad del recubrimiento obtenido por medio del método según la invención y confirmar las capacidades de osteointegración del mismo, se evaluó la cantidad de fosfatos de calcio depositada en las muestras de SUMNa después de 14 días de inmersión en disolución de SBF. Después de 14 días de inmersión, se observa que las superficies de las muestras SUMNa muestran una mayor cantidad de fosfatos de calcio que los controles (Figuras 8A, 8C y 8E). Además, los análisis EDS realizados en las muestras después de 14 días de inmersión en SBF muestran la presencia de calcio y fósforo en todas las superficies (Figuras 8B, 8D y 8F). En particular, la muestra de titanio no tratado (Ti de la muestra) muestra un pico de titanio mucho más intenso. Esto indica que el recubrimiento de fosfato de calcio sobre la superficie es limitado (Figura 8B).

El análisis XRD realizado después de 14 días de inmersión de las muestras en SBF muestra la presencia de hidroxiapatito (HA) sobre la superficie de las muestras SUMNa y de las muestras de BS, pero no en el titanio no tratado (Figuras 9A, 9B y 9C). Los picos de la fase cristalina de HA no destacan claramente debido a la presencia de HA en la fase amorfa.

Las investigaciones metalográficas hacen posible mejorar la comprensión de la extensión del fenómeno de mineralización en cada muestra. Estas investigaciones no muestran la presencia de HA en el titanio no tratado (Ti), revelan la presencia de una capa de HA con un espesor de  $5\ \mu\text{m}$  en las muestras de BS y la presencia de una superficie mucho más bioactiva en las muestras de SUMNa, con un espesor de HA de  $12\ \mu\text{m}$  (Figuras 10A, 10B y 10C). Por lo tanto, las muestras tratadas con el método según la invención tienen un mayor potencial de mineralización que la BS de control y tienen características químicas y morfológicas capaces de inducir una mayor deposición de fosfatos de calcio. Este mecanismo constituye una etapa fundamental en el fenómeno de osteointegración.

Los resultados celulares obtenidos confirman que la superficie sometida a tratamiento SUMNa no es citotóxica, proporciona a las células puntos de anclaje preferentes para adhesión debido a la rugosidad de la superficie y constituye un entorno favorable para la existencia de sus actividades metabólicas.

El ensayo de Azul Alamar muestra que se observa una mayor vitalidad celular con muestras de SUMNa que con la BS de control. El tratamiento en NaOH experimentado por las muestras de SUMNa es decisivo en el incremento en vitalidad celular. Previamente a este ataque químico alcalino, la vitalidad celular en las muestras SUMNa es de hecho comparable con la de los controles (Figura 11). El tratamiento con disolución alcalina interviene en general por modificación de tanto las propiedades morfológicas como las propiedades químicas del recubrimiento: la hidroxilación de la superficie con enriquecimiento de grupos -OH es uno de los efectos típicos producidos.

El análisis SEM de morfología celular muestra que las células MG63 se han adherido fuertemente a la superficie de los diversos materiales. En particular, en las muestras de SUMNa y BS las células forman una estructura uniforme y multicapa (Figuras 12B y 12C). Sólo son visibles cuerpos celulares aislados en el titanio no tratado (Figura 12A). En vista de la morfología porosa particular de las muestras SUMNa, es difícil poder identificar los cuerpos celulares puesto que se mezclan con las porosidades (Figura 12C).

En cuanto a la cantidad de colágeno I depositado por las células después de 7 días de cultivo celular, no se observan variaciones significativas entre las diversas superficies (Figura 13).

El nivel de osteocalcina depositado por las células MG63 después de 7 días de cultivo en las diversas muestras es mayor en muestras SUMNa que en los controles, que muestran una menor deposición (Figura 14). Puesto que la osteocalcina es uno de los marcadores bioquímicos más significativos de neoformación ósea y remodelado, estos

datos indican que el método según la presente invención es el que mejor fomenta el mecanismo ligado a la diferenciación celular y a la osteogénesis.

5 Se realizaron ensayos para la adsorción de proteínas en suero humano basándose en el hecho de que el primer mecanismo después de implantación en un entorno biológico consiste en contacto entre proteínas sanguíneas y la superficie del material del implante. La película de la proteína que se deposita como consecuencia de este primer contacto es fundamental en la guía del posterior procedimiento de osteointegración del implante y la respuesta celular. Los ensayos conducidos investigaron los niveles de fibronectina y albúmina adsorbidos en las superficies. El indicador más interesante es la relación entre la fibronectina y albúmina adsorbidas; este indicador muestra que las muestras SUMNa presentan una adsorción selectiva y preferente de fibronectina con respecto a los controles, que  
10 implica así un mayor potencial de osteointegración del tratamiento innovador (Figura 15).

En la práctica se ha encontrado posible tener sustratos metálicos modificados en la superficie que se tienen que usar como prótesis, caracterizados por altas capacidades de integración en tejidos biológicos.

15 Por otra parte, se ha encontrado que el sustrato metálico modificado en la superficie de la invención tiene tanto grupos químicos funcionales como elementos químicos específicos capaces de facilitar integración del sustrato en tejidos biológicos y al mismo tiempo muestra una morfología modificada, dándole una estructura microporosa.

Finalmente, se ha encontrado que los sustratos se pueden usar como prótesis, puesto que se caracterizan por simplicidad en la ejecución y costes competitivos.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sustrato de un metal seleccionado del grupo que consiste en: titanio, tántalo, aleaciones de titanio y aleaciones de tántalo, modificado por deposición sobre la superficie del mismo de una capa del óxido del mismo metal, caracterizado por que dicha capa:

- 5
- está enriquecida con Ca, P, Si y Na,
  - presenta una morfología resistente y adhesiva microporosa,
  - está provista de grupos químicos -OH.

2. El sustrato según la reivindicación 1, en el que dicho metal es titanio.

10 3. Uso del sustrato según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, para preparar prostodoncia y prótesis de articulaciones ortopédicas.

4. Una prótesis hecha del sustrato de metal modificado superficialmente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

5. Un implante hecho del sustrato de metal modificado superficialmente según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

15

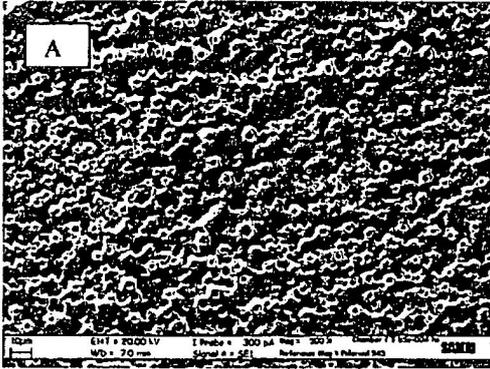


Fig. 1A

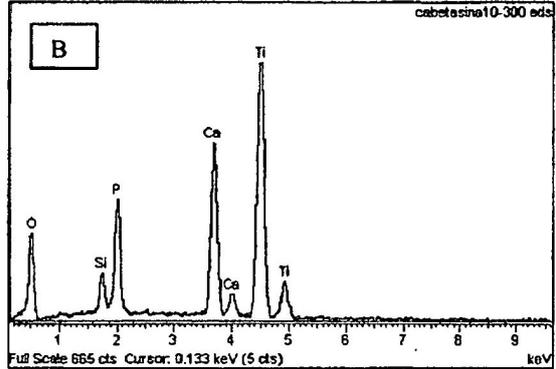


Fig. 1B

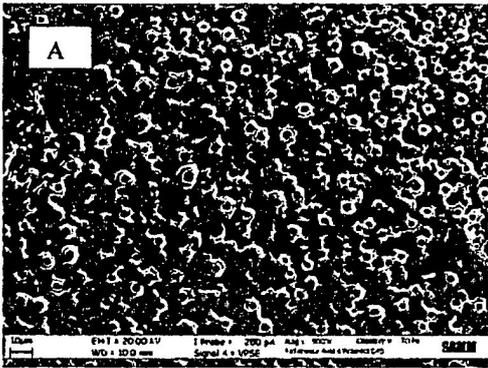


Fig. 2A

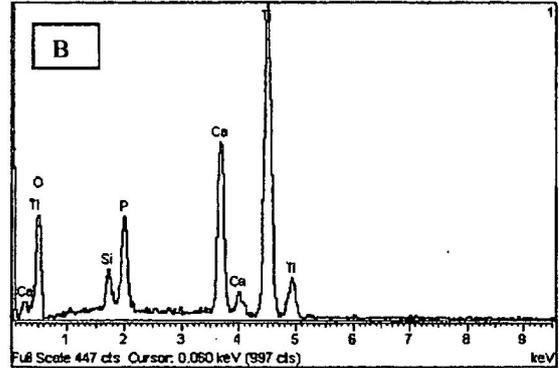


Fig. 2B

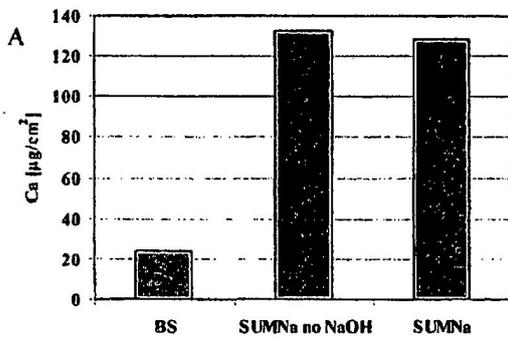


Fig. 3A

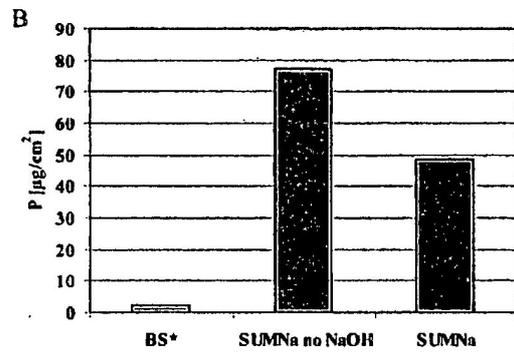


Fig. 3B

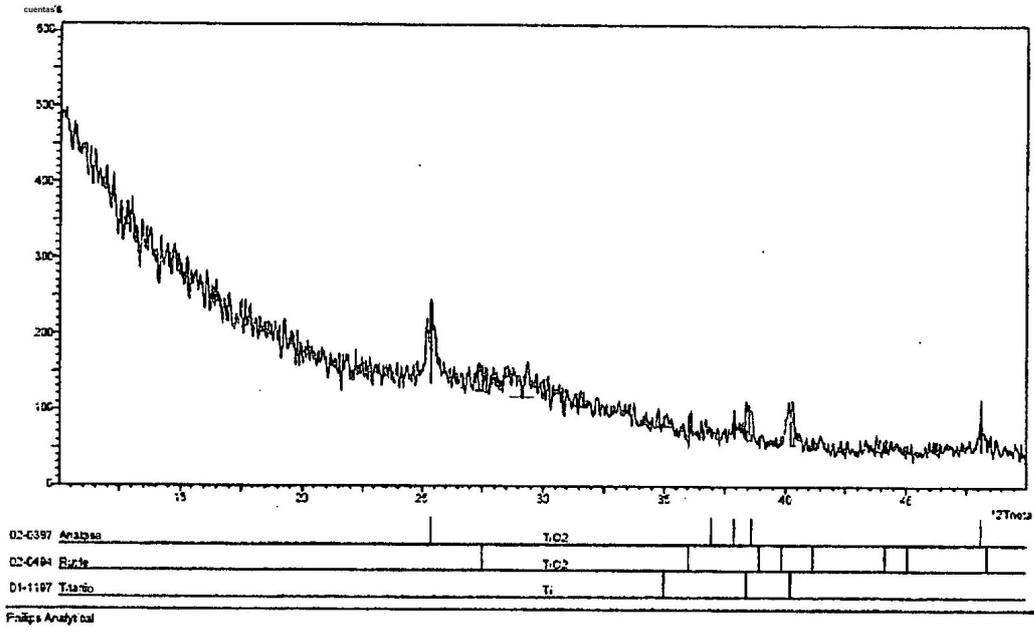


Fig. 4A

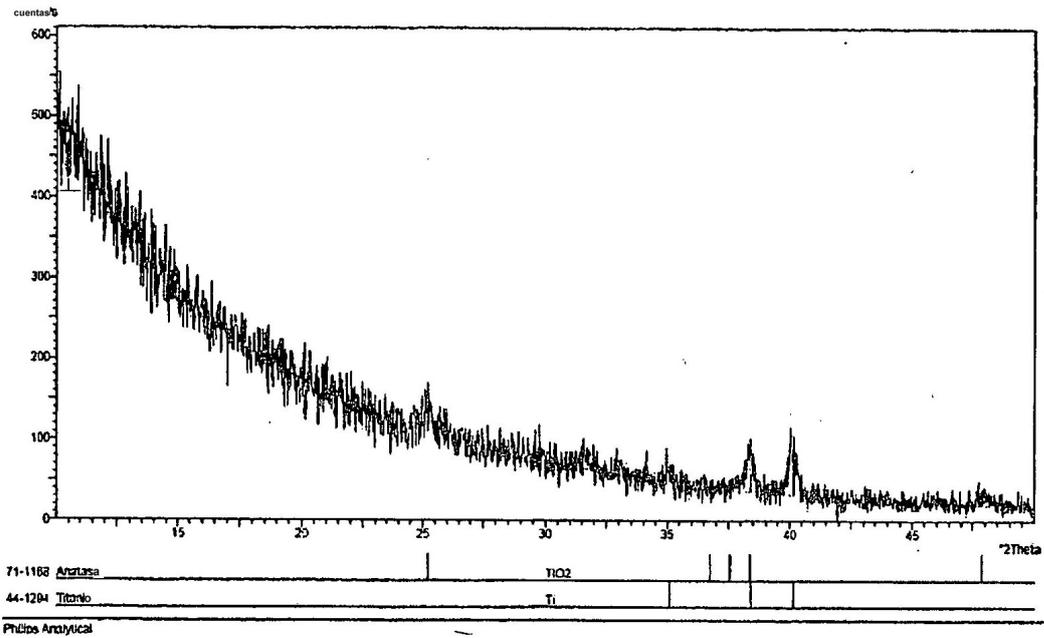
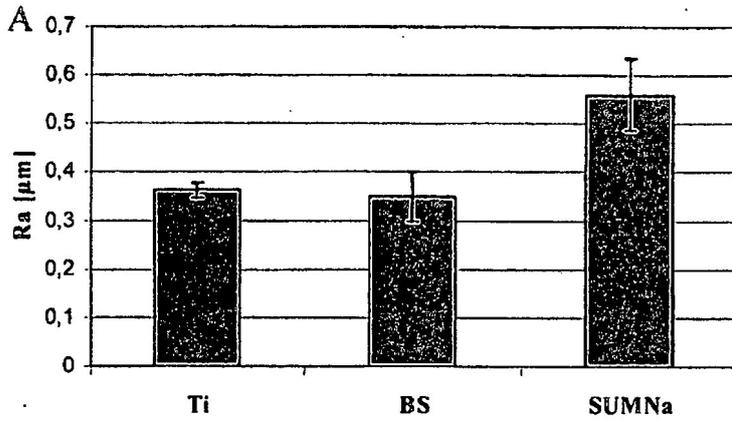
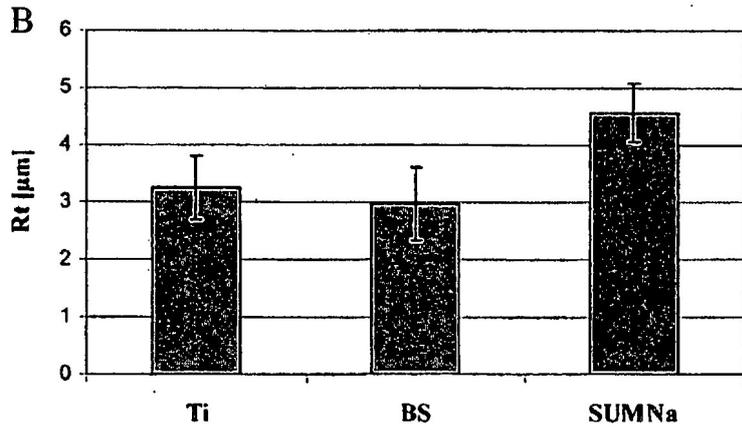


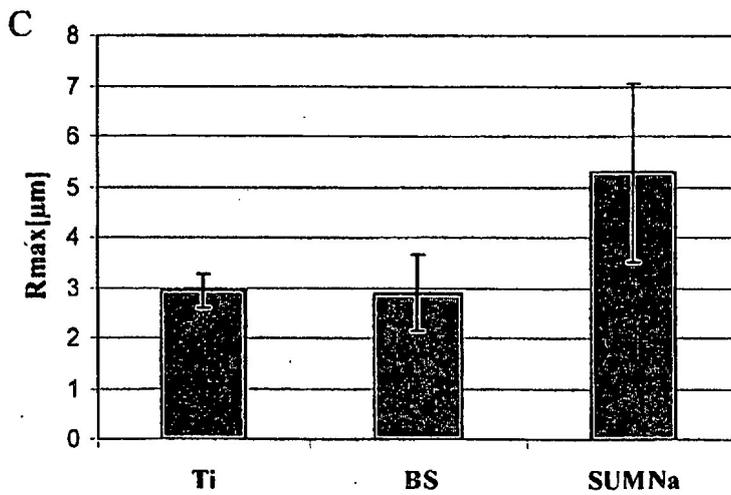
Fig. 4B



*Fig. 5A*



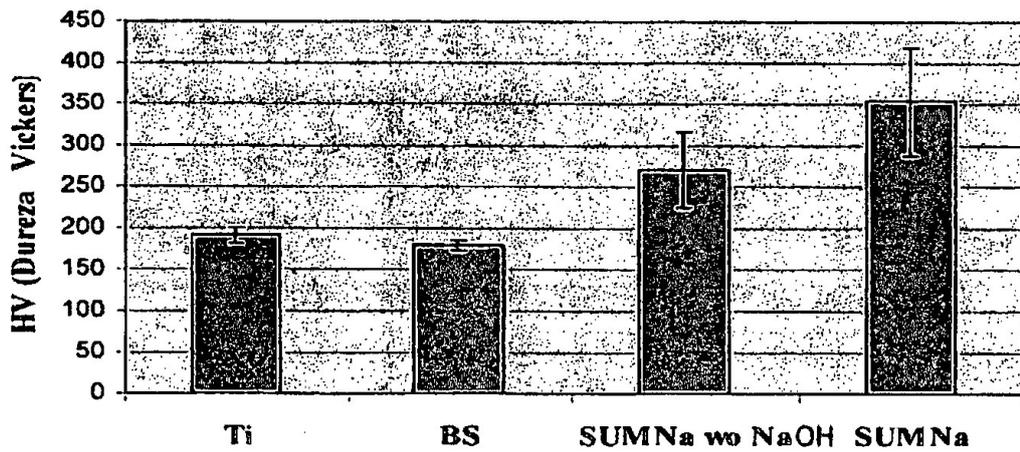
*Fig. 5B*



*Fig. 5C*

	$R_a$	$R_t$	$R_{max}$
<b>Ti</b>	0,3624	2,9434	3,2434
<b>BS</b>	0,3494	2,8856	2,9745
<b>SUMNa</b>	0,5610	5,2933	4,568

*Fig. 5D*



*Fig. 6*

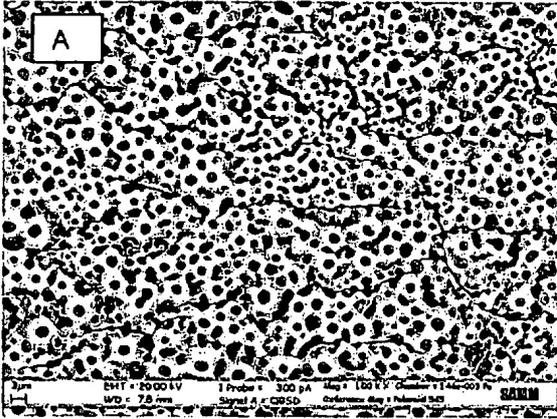


Fig. 7A

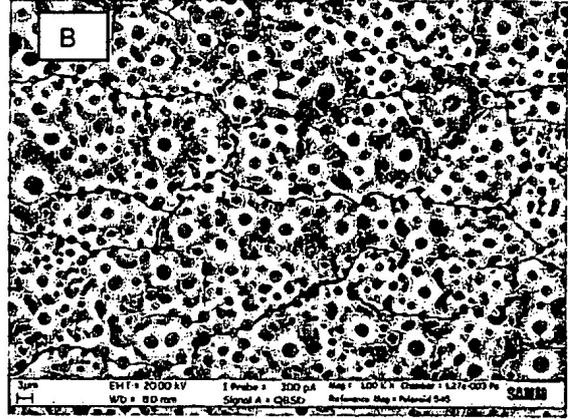


Fig. 7B

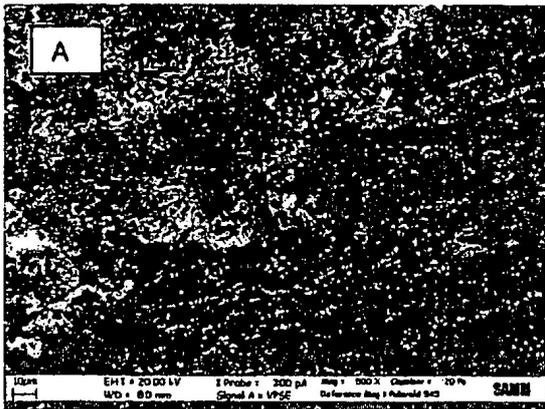


Fig. 8A

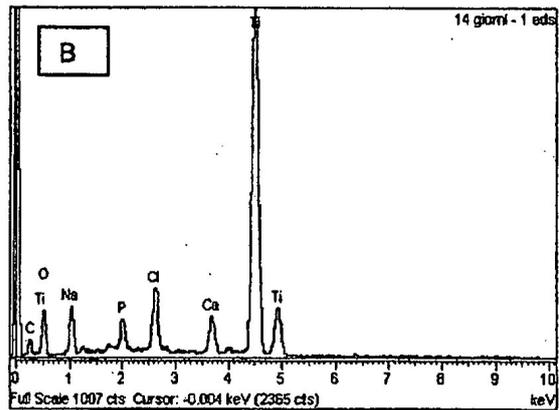


Fig. 8B

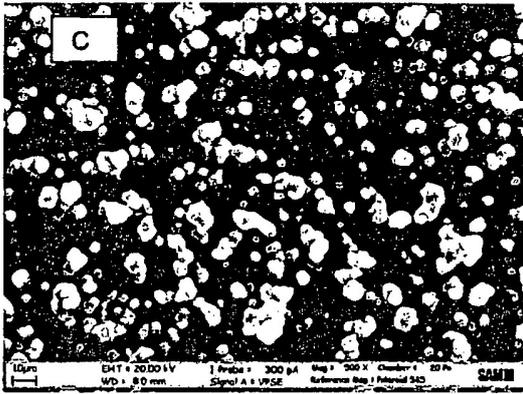


Fig. 8C

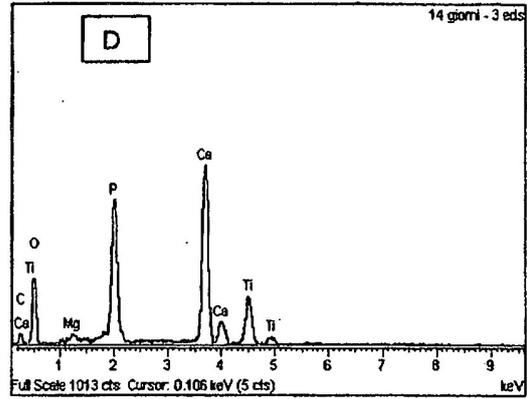


Fig. 8D

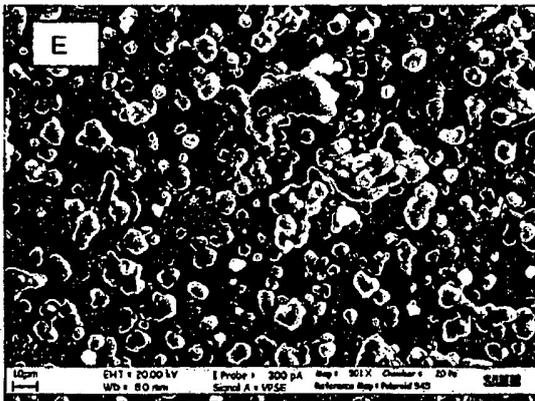


Fig. 8E

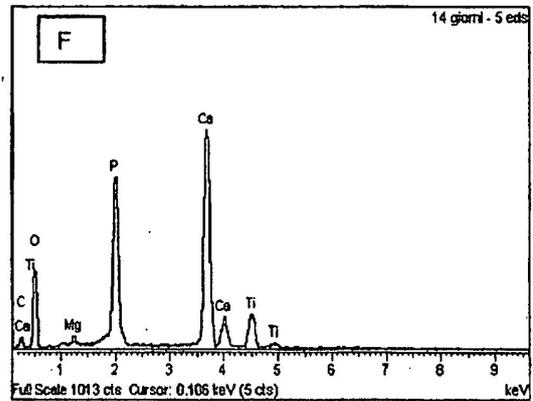


Fig. 8F

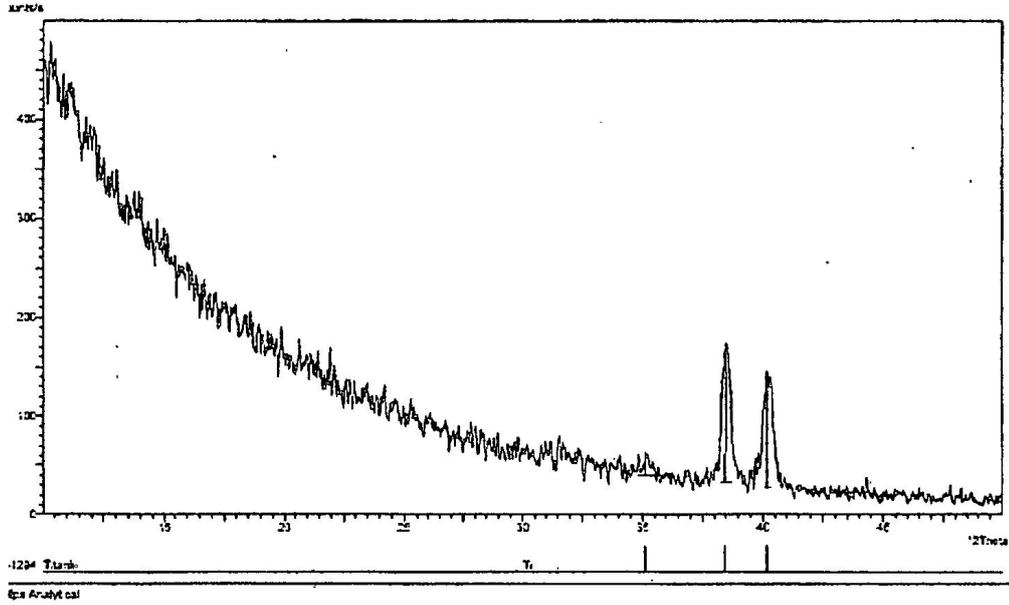


Fig. 9A

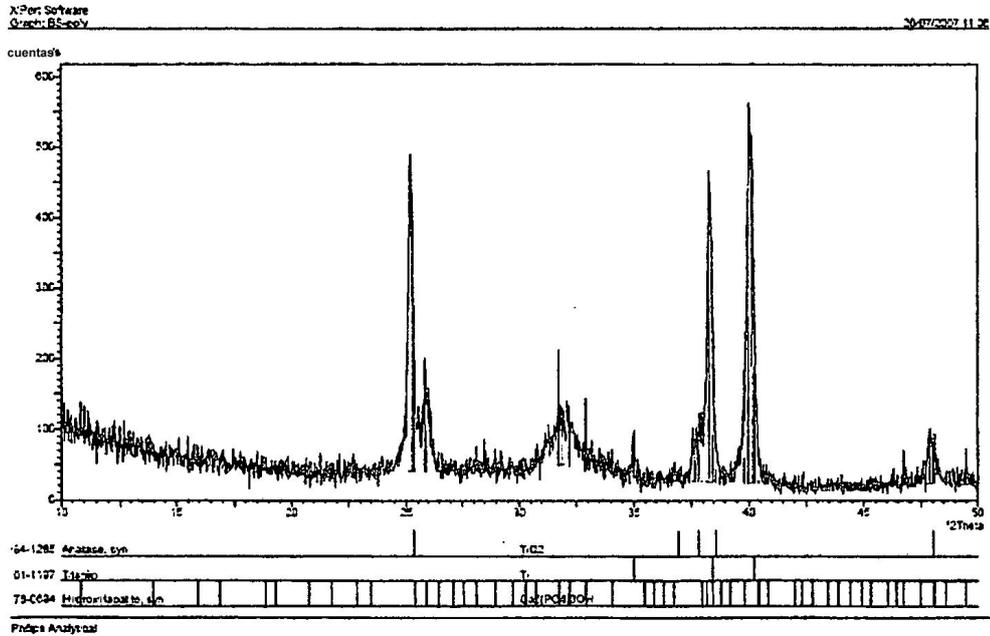


Fig. 9B

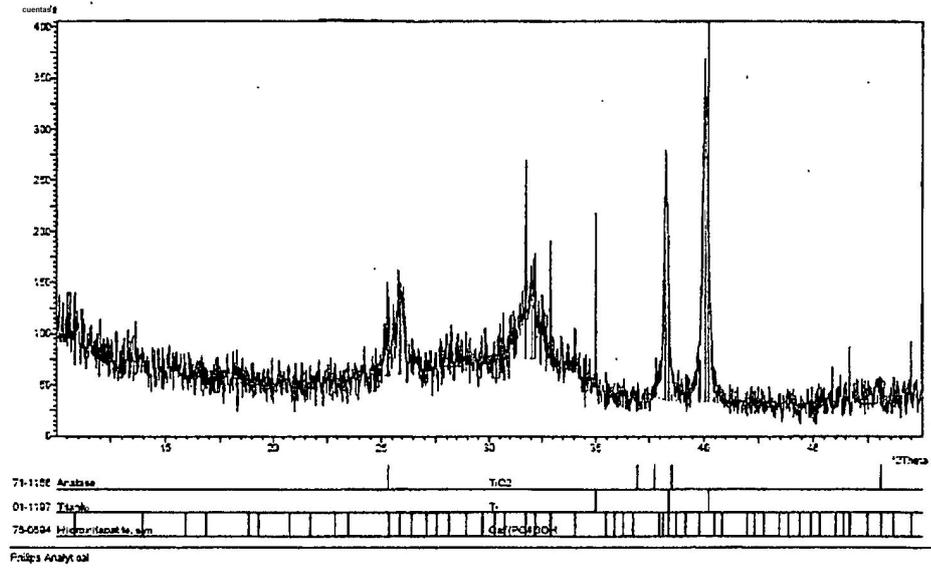


Fig. 9C

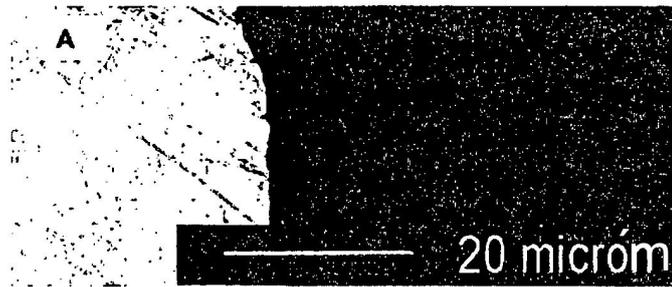


Fig. 10A

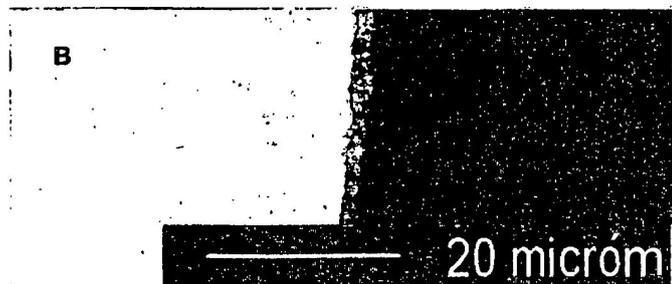


Fig. 10B

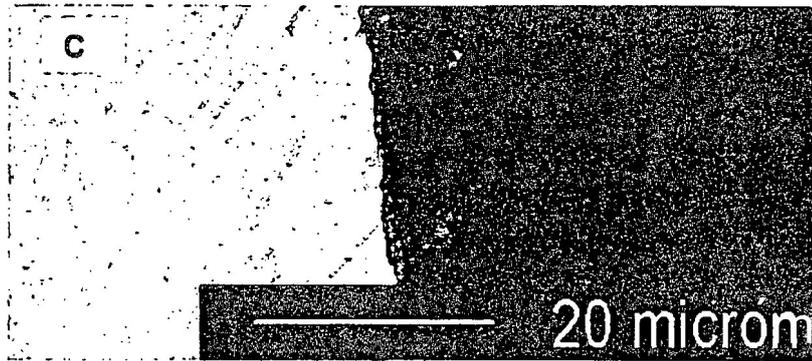


Fig. 10C

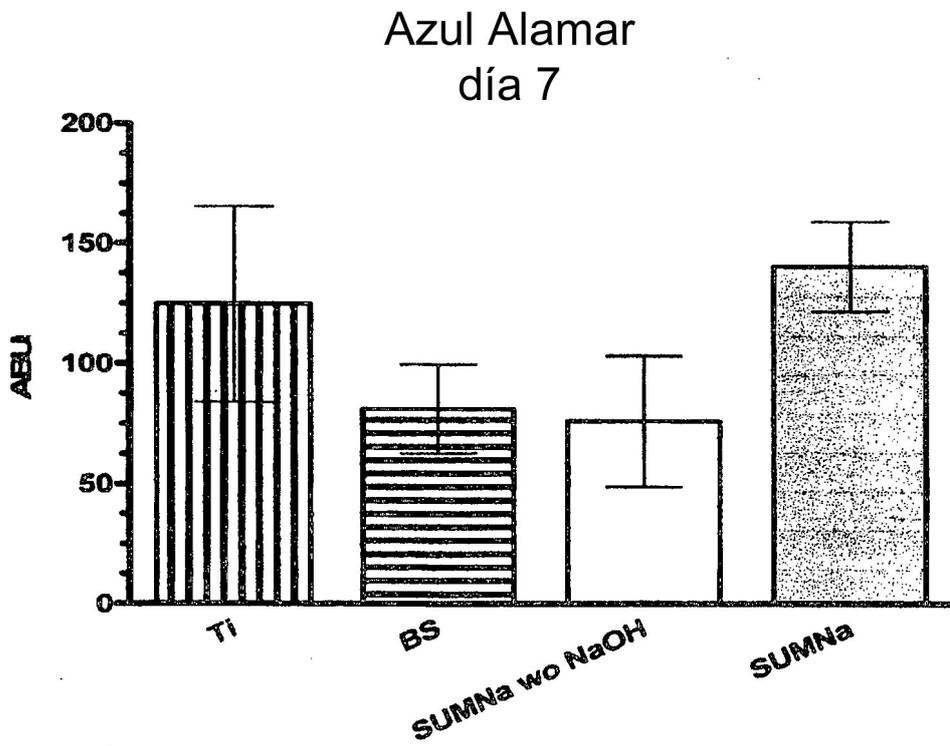


Fig. 11

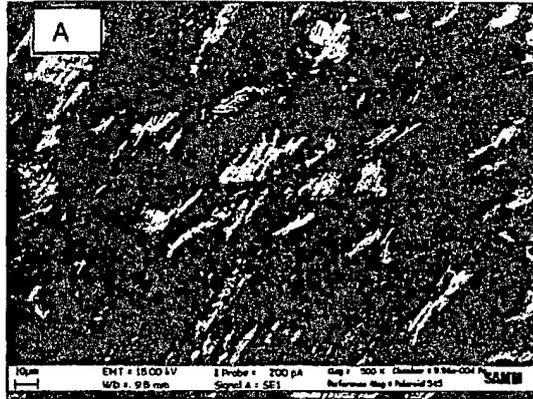


Fig. 12A

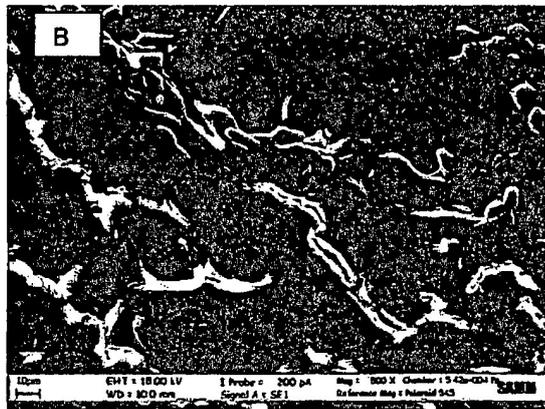


Fig. 12B

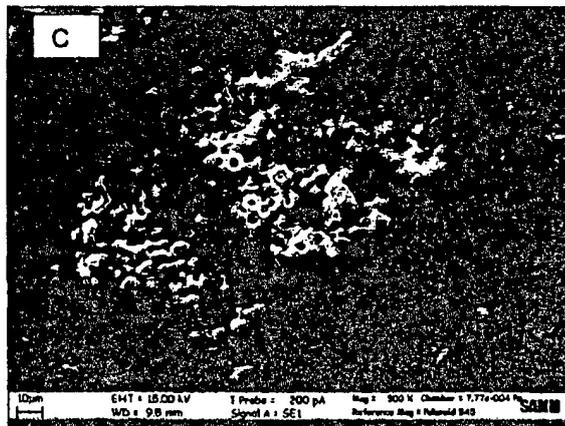


Fig. 12C

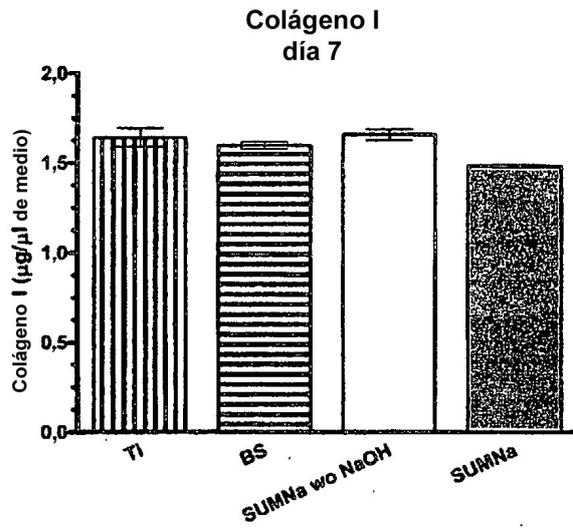


Fig. 13

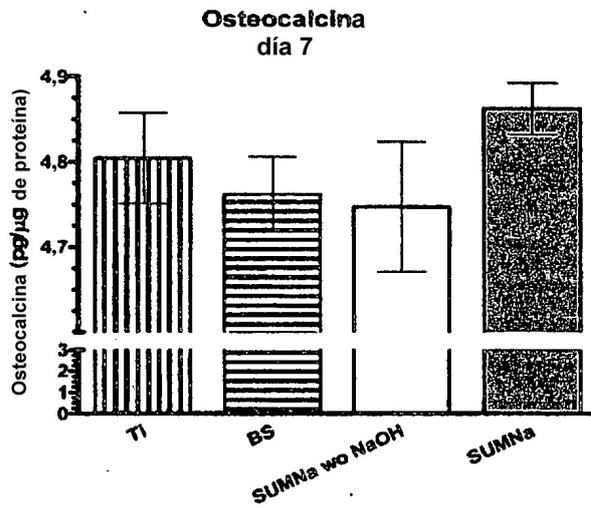


Fig. 14

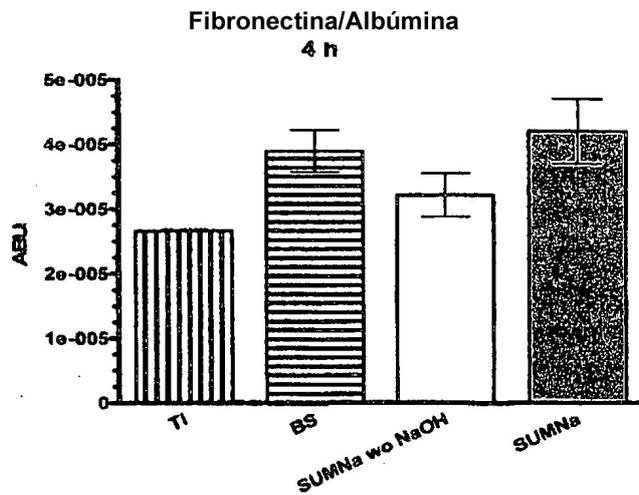


Fig. 15