

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 832**

21 Número de solicitud: 201331756

51 Int. Cl.:

**A61L 27/06** (2006.01)  
**A61L 27/54** (2006.01)  
**C23C 22/60** (2006.01)  
**C23C 22/73** (2006.01)  
**C23C 22/83** (2006.01)  
**A61L 33/12** (2006.01)  
**A61L 33/14** (2006.01)  
**A61F 2/02** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**02.12.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.03.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
 (100.0%)  
 Jordi Girona, 31  
 08034 Barcelona ES**

72 Inventor/es:

**SEVILLA SÁNCHEZ, Pablo;  
 GODOY GALLARDO, María y  
 GIL MUR, Francisco Javier**

54 Título: **Procedimiento de funcionalización de superficies de titanio**

57 Resumen:

Procedimiento de funcionalización de superficies de titanio, que comprende (a) añadir a dichas superficies NaOH a una concentración entre 1 y 8 M, (b) mantener en contacto dichas superficies con el NaOH añadido en la etapa anterior durante 2 a 24 horas a una temperatura entre 20 y 90°C, (c) sumergir bajo atmósfera inerte dichas superficies en una disolución de 3-(trietoxisilil)propil anhídrido succínico (TESPSA) 0,05 a 0,3 mM en un recipiente tapado y (d) mantener una temperatura entre 20 y 100°C durante un tiempo entre 30 minutos y 3 horas.

ES 2 445 832 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de funcionalización de superficies de titanio

### CAMPO DE LA INVENCION

- 5 El campo de la presente invención se refiere a procedimientos de funcionalización de superficies de titanio, que presentan propiedades antibacterianas y capacidad de diferenciación osteoblástica en el tejido circundante a la superficie de titanio. El material de titanio se puede incorporar en implantes sustitutivos de tejidos duros.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la producción de implantes para ingeniería de tejidos la superficie del material juega un papel importante en la respuesta biológica del individuo respecto al material implantado.

- 10 Una de las modificaciones superficiales que actualmente se están realizando son las modificaciones bioquímicas de los metales (en este caso el titanio) con el propósito de inducir a la especificación celular y la respuesta de los tejidos mediante la inmovilización de péptidos, de proteínas o de factores de crecimiento.

- 15 La modificación bioquímica puede ser realizada a partir de diferentes técnicas aprovechando la adsorción física o la unión química. La unión química envuelve una unión covalente entre el péptido y el metal de manera irreversible siendo esta técnica más popular que la adsorción física ya que el enlace molecular es más estable bajo las condiciones fisiológicas.

El titanio posee una capa natural de óxido superficial cuyo grosor es aproximadamente de 4-6 nm. Esta capa es relativamente inerte, sin embargo unos pocos agentes orgánicos son capaces de realizar enlaces químicos fuertes con esta superficie, en los cuales están incluidos los organosilanos, organofosfatos y elementos químicos fotosensibles.

- 20 Del grupo de los organosilanos entre los más utilizados cabe destacar el 3-aminopropil-trietoxi-silano (APTES) el cual interacciona con los grupos hidroxilos de la superficie metálica activada mediante sus alcoholes, y la parte de amina se hace reaccionar con un cross-linker (N-succinimedy-3-Maleimidopropionate) dándole la capacidad de enlazarse con una secuencia peptídica.

Otros tipos de organosilanos utilizados actualmente son los que presentan en su grupo funcional un etilenglicol o metilo.

- 25 El problema que presenta el estado de la técnica consiste en proporcionar un procedimiento de funcionalización de superficies de titanio alternativo a los descritos en el estado de la técnica. La presente invención, tal y como se describe en la presente solicitud, propone un procedimiento alternativo de funcionalización de superficies de titanio que soluciona dicho problema técnico.

- 30 El procedimiento de la invención proporciona superficies de titanio funcionalizadas con propiedades mejoradas respecto a las superficies descritas en el estado de la técnica, entre las que cabe citar un menor efecto citotóxico y mejores propiedades antibacterianas.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Una realización preferida de la presente invención es un procedimiento de funcionalización de superficies de titanio, caracterizado por que comprende:

- 35 (a) añadir a dichas superficies NaOH a una concentración entre 1 y 8 M,  
(b) mantener en contacto dichas superficies con el NaOH añadido en la etapa anterior durante 2 a 24 horas a una temperatura entre 20 y 90°C,  
(c) sumergir bajo atmósfera inerte dichas superficies en una disolución de 3-(trietoxisilil)propil anhídrido succínico (TESPSA) 0,05 a 0,3 mM en un recipiente tapado y  
40 (d) mantener una temperatura entre 20 y 100°C durante un tiempo entre 30 minutos y 3 horas.

en adelante procedimiento de la invención.

- En el procedimiento de la invención, se pueden limpiar las muestras de titanio antes de comenzar a realizar las etapas del procedimiento. Posteriormente se activa la superficie del material añadiendo NaOH a una concentración entre 1 y 8 M (etapa (a)) y manteniendo en contacto dichas superficies con el NaOH añadido en la etapa anterior durante 2 a 24 horas a una temperatura entre 20 y 90°C (etapa (b)). Como resultado se obtiene la superficie de titanato de sodio  
45 activado con un alto valor de superficie específica.

El siguiente paso a seguir es la incorporación del TESPSPA a la superficie del material. Para ello, se sumergen dichas superficies en una disolución de TESPSPA en un recipiente tapado bajo atmósfera inerte (etapa (c)) y se mantiene una temperatura entre 20 y 100°C durante un tiempo entre 30 minutos y 3 horas (etapa (d)).

5 El procedimiento de la invención proporciona propiedades antibacterianas a las superficies de titanio e induce capacidad de diferenciación osteoblástica en el tejido circundante a la superficie de titanio.

Otra realización es el procedimiento de la invención, donde la concentración de NaOH es 5 M, el tiempo de la etapa (b) es 24 horas, la temperatura de la etapa (b) es 60°C y la concentración de 3-(trietoxisilil)propil anhídrido succínico (TESPSPA) es 0,1 mM.

Otra realización es el procedimiento de la invención, que comprende las siguientes etapas después de la etapa (d):

10 (e) lavar dichas superficies en agua,

(f) aplicar ultrasonidos a dichas superficies y

(g) lavar dichas superficies con etanol, isopropanol, agua y acetona y secar con nitrógeno.

15 Existe la opción de romper el grupo anhidro que se ha obtenido en la etapa (d) formando dos grupos carboxílicos mediante hidrólisis y transformarlos en ésteres activos. Estos grupos facilitan una posterior incorporación de biomoléculas.

Por tanto, otra realización es el procedimiento de la invención, que comprende la siguiente etapa después de la etapa (e), (f) o (g):

20 (h) sumergir dichas superficies en una disolución de N-Hidroxisuccinimida (NHS) o N-Hydroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), y N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocioruro (EDC) o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentil) carbodiimida, entre 0.1 M y 0.2 M y mantener dichas superficies sumergidas de 30 a 60 minutos.

En la etapa (h), se pueden sumergir dichas superficies en una disolución acuosa de NHS-EDC entre 0.1 M y 0.2 M utilizando como disolvente una solución de ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) a un valor de pH entre 6 y 8 y se mantienen dichas superficies sumergidas de 30 a 60 minutos.

25 El procedimiento de la invención funcionaliza superficies de titanio. Las características superficiales del titanio tienen una gran influencia en la adsorción de proteínas, lípidos, azúcares e iones de los fluidos del cuerpo. La adsorción de proteínas sobre implantes de titanio se da en pocos minutos e incluso la adsorción de pequeñas moléculas es aún más rápida. Esta adsorción es importante para la posterior adhesión celular puesto que dicha adhesión variará según sea la capa de proteínas adsorbidas. Específicamente, la adhesión celular osteoblástica (osteoblastos MG-63) depende de la presencia de vitronectina o fibronectina en la superficie, dándose la unión por medio de las integrinas de las células. Las integrinas son receptores celulares situados en la membrana celular y capaces de reconocer lugares específicos de las proteínas de unión. ).

30 Por tanto, otra realización es el procedimiento de la invención, que comprende la siguiente etapa después de la etapa (h):

(i) sumergir dichas superficies en una disolución que comprende proteína, péptido o amino polietilenglicol.

35 De forma particular, dicha proteína es vitronectina o fibronectina.

En el ejemplo 2 se ha estudiado el efecto citotóxico de las superficies de titanio obtenidas según el procedimiento de la invención y se ha comprobado que no hay efectos citotóxicos por parte de las superficies modificadas sobre células MG-63.

40 En el ejemplo 3 se ha estudiado la adhesión bacteriana a las superficies de titanio obtenidas según el procedimiento de la invención. En dicho ejemplo se han utilizado las cepas *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus salivarius*.

*Streptococcus sanguinis* es un colonizador primario, muy importante en la formación de la placa dento-bacteriana, facilitando la incorporación de otras bacterias periodonto patogénicas. *S. sanguinis* es la primera bacteria que coloniza los tejidos duros y sintetiza ácido paraaminobenzoico, un factor de crecimiento necesario para *Streptococcus mutans*.

45 El *Lactobacillus salivarius* puede encontrarse en distintos lugares de la boca, en la lengua, sobre los dientes etc., siendo mayor su presencia en la saliva. Esta cepa junto con otros *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. fermenti*) pueden adherirse a cualquier superficie de la boca, y pueden llegar a bajar el pH bucal. Esta acidificación en la saliva puede afectar tanto al implante como al tejido adyacente causando un daño a la superficie del implante.

50 La adhesión bacteriana inicial a las superficies de titanio es el resultado de las interacciones específicas (adhesión de la matriz extracelular de la bacteria a proteínas situadas sobre el implante como son la fibronectina y colágeno) e interacciones inespecíficas (fuerzas fisicoquímicas), además de otros factores como son las características superficiales

del implante (energía superficial, hidrofobicidad, química de la superficie etc). Posterior a dicha adhesión inicial, hay una incorporación de bacterias desarrollándose una monocapa con la excreción simultánea de material extracelular formando un biofilm sobre la superficie del material.

5 En el estudio realizado en el ejemplo 3 se ha comprobado que las superficies funcionalizadas de titanio obtenidas según el procedimiento de la invención presentaron una disminución de adhesión de *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus salivarius*, y, por tanto, las superficies obtenidas según el procedimiento de la invención tienen mejores propiedades antibacterianas que las superficies funcionalizadas con APTES.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 La Figura 1 representa la estabilidad mecánica en función del tiempo para muestras de titanio (rombos), muestras de titanio funcionalizado con APTES (cuadrados) y para muestras del titanio funcionalizado con TESPSA (triángulos).

La Figura 2 representa el porcentaje de células (MG-63) adheridas a la superficie de las muestras de titanio. Se representan los resultados de la muestra control con titanio pulido sin tratar (barra izquierda), los resultados de titanio silanizado con TESPSA (barra central) y los resultados de la muestra control de las células sin exposición a superficies de titanio (barra derecha).

15 La Figura 3 representa la cantidad de colonias de la bacteria *Streptococcus sanguinis* después de 24 h de cultivo sobre las muestras de titanio. Se representan los resultados de la muestra control con titanio pulido sin tratar (barra izquierda) y los resultados de titanio silanizado con TESPSA (barra derecha).

#### MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Ejemplo 1. Funcionalización de superficies de titanio. Ensayos de estabilidad mecánica.

20 5 muestras de titanio pulidas, para cada una de las 3 condiciones estudiadas (Titanio, titanio silanizado con APTES y titanio silanizado con TESPSA) se sumergieron en NaOH 5 M a 60 °C durante 24 h. Posteriormente, se lavaron en agua durante 1 h. Posteriormente, las muestras correspondientes se silanizaron introduciéndolas en un envase hermético con atmósfera de nitrógeno y sumergidas en una solución de APTES o TESPSA 0,1 mM en tolueno durante 1 hora a 70 °C con agitación.

25 Posteriormente, las muestras se lavaron sumergiéndolas en una serie de disolventes: etanol, isopropanol, agua destilada y acetona. Finalmente, estas superficies se sumergieron en una disolución acuosa de NHS-EDC entre 0.1 M y 0.2 M utilizando como disolvente una solución de ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) a un valor de pH 8.0 y se mantuvieron dichas superficies sumergidas 30 minutos y subsiguientemente se lavaron en agua destilada.

30 Las muestras se marcaron fluorescentemente sumergiéndolas en una solución de dimetil formamida con 50 µmol/l de fluoresceína durante 2 horas a temperatura ambiente.

35 El marcaje fluorescente permitió evaluar las superficies mediante microscopía de fluorescencia y espectrofluorofotometría. Las diferentes superficies se sumergieron en una disolución tampón fosfato a pH 7,4 y se sometieron a ultrasonidos por diferentes tiempos y a continuación se midió la fluorescencia remanente en las superficies comparada con la fluorescencia inicial. Finalmente se representó el resultado de fluorescencia remanente en función del tiempo de sonicación en cada condición del experimento.

#### *Resultados*

40 Los resultados obtenidos demostraron que la silanización mediante el silano TESPSA presenta una mejor estabilidad mecánica del péptido fluorescente covalentemente anclado a la superficie durante las primeras horas de sonicación en comparación a la silanización con APTES o simple adsorción del péptido sobre titanio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2. Ensayos de citotoxicidad biológica en células MG-63 de superficies de titanio funcionalizadas

#### *Metodología*

45 Se han utilizado como muestras control titanio pulido sin tratar y el poliestireno de la placa de pocillos (*Tissue Culture PolyStyrene*, TCPS) La muestra de estudio corresponde a titanio silanizado con TESPSA tal y como es obtenido en el ejemplo 1.

50 Se prepararon tres réplicas por cada tipo de tratamiento. Las muestras se sumergieron en etanol durante 10 minutos para su desinfección. Una vez en zona estéril controlada, se sembraron 5000 células MG-63 por pocillo en cada una de las muestras y se realizó la recta patrón para el cálculo de la viabilidad celular. Se analizó la actividad celular a las 24 horas de incubación y para ello inicialmente se limpiaron las muestras dos veces con PBS estéril, se lisaron con M-PER® (Pierce, USA) y se guardaron a -80°C antes de realizar la medida del lactato deshidrogenasa (LDH). Finalmente

se realizó la lectura del LDH liberado al medio siguiendo el protocolo Cytotoxicity Detection Kit LDH de la casa Roche Applied Science. Se obtuvo la densidad óptica de los pocillos a 492 nm.

#### Resultados

5 Se demostró que no hay efectos citotóxicos en células MG-63 de las superficies modificadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 3. Ensayos de adhesión bacteriana de *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus salivarius* a superficies de titanio funcionalizada

#### Metodología

10 Se ha utilizado como muestra control titanio pulido y como muestra de estudio titanio silanizado con TESPSA tal y como se ha obtenido en el ejemplo 1.

15 Las cepas *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus salivarius* fueron incubadas durante 18 horas y diluidas con medio fresco hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0,2 a 600 nm (equivalente a 10<sup>8</sup> UFC/ml). En dicha solución fueron sumergidas las muestras previamente esterilizadas (sumergidas un mínimo de 10 minutos en etanol en condiciones estériles y lavadas dos veces con PBS 1X estéril) durante dos horas dándose la adhesión bacteriana sobre las superficies.

Las muestras se limpiaron dos veces con PBS 1X templado eliminando, de esta manera, aquellas bacterias no adheridas. Seguidamente las muestras fueron introducidas en tubos tipo eppendorf, se les añadió 1 ml de una solución de sales (8.5 g de NaCl en 1 l de H<sub>2</sub>O) y se agitaron con vórtex durante 5 minutos. Finalmente se extrajeron las bacterias adheridas a la superficie de la muestra.

20 Sobre una placa de agar se sembraron 100 µl de la solución diluida correspondiente y las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C, contando manualmente las unidades formadoras de colonias (CFU). Estos resultados fueron normalizados según el área real de la muestra y su grosor.

#### Resultados

25 Las superficies funcionalizadas de titanio presentaron una disminución de adhesión de *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus salivarius* una vez el titanio ha sido modificado superficialmente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 4. Ensayos de diferenciación osteoblástica de línea celular humana SAOS-2.

#### Metodología

30 Se utilizó como muestra control titanio pulido y como muestra de estudio titanio silanizado con TESPSA tal y como se ha obtenido en el ejemplo 1. como control de la buena salud celular se ha utilizado el poliestireno de la placa de pocillos (*Tissue Culture PolyStyrene*, TCPS)

35 Se prepararon tres réplicas por cada tipo de tratamiento. Las muestras se sumergieron en etanol durante 10 minutos para su desinfección. Una vez en zona estéril controlada, se sembraron 5000 células SAOS-2 por pocillo en cada una de las muestras. Se analizó la actividad de la fosfatasa alcalina a las 24 horas de incubación y a los 7, 14 y 21 días de incubación. Para ello inicialmente se limpiaron las muestras dos veces con PBS estéril, se lisaron con M-PER® (Pierce, USA) y se guardaron a -80°C antes de realizar la medida del lactato deshidrogenasa (LDH). Finalmente se realizó la lectura de la actividad de la fosfatasa alcalina siguiendo el protocolo Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) de la casa Abcam. Se obtuvo la densidad óptica de los pocillos a 405 nm.

#### Resultados

40 Las superficies de titanio funcionalizadas mediante el procedimiento que aquí se reivindica presentaron una mayor producción de fosfatasa alcalina en comparación con superficies de titanio pulido, presentando diferencias estadísticamente significativas a los 14 y 21 días de cultivo. Estos resultados indican una mayor diferenciación de células osteoblásticas adheridas a las superficie de titanio tratado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de funcionalización de superficies de titanio, caracterizado por que comprende:
  - (a) añadir a dichas superficies NaOH a una concentración entre 1 y 8 M,
  - (b) mantener en contacto dichas superficies con el NaOH añadido en la etapa anterior durante 2 a 24 horas a una temperatura entre 20 y 90°C,
  - (c) sumergir bajo atmósfera inerte dichas superficies en una disolución de 3-(trietoxisilil)propil anhídrido succínico (TESPSA) 0,05 a 0,3 mM en un recipiente tapado y
  - (d) mantener una temperatura entre 20 y 100°C durante un tiempo entre 30 minutos y 3 horas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la concentración de NaOH es 5 M, el tiempo de la etapa (b) es 24 horas, la temperatura de la etapa (b) es 60°C y la concentración de 3-(trietoxisilil)propil anhídrido succínico (TESPSA) es 0,1 mM.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que comprende las siguientes etapas después de la etapa (d):
  - (e) lavar dichas superficies en agua,
  - (f) aplicar ultrasonidos a dichas superficies y
  - (g) lavar dichas superficies con etanol, isopropanol, agua y acetona y secar con nitrógeno.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende la siguiente etapa después de la etapa (e), (f) o (g):
  - (h) sumergir dichas superficies en una disolución de N-Hidroxisuccinimida (NHS) o N-Hydroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), y N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida hidrocloreuro (EDC) o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentil) carbodiimida, entre 0.1 M y 0.2 M y mantener dichas superficies sumergidas de 30 a 60 minutos.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que comprende la siguiente etapa después de la etapa (h):
  - (i) sumergir dichas superficies en una disolución que comprende proteína, péptido o amino polietilenglicol.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicha proteína es vitronectina o fibronectina.

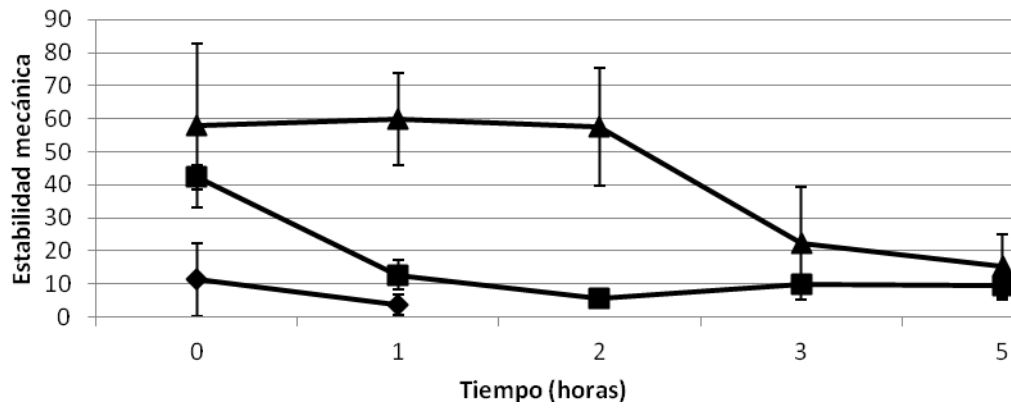


Fig. 1

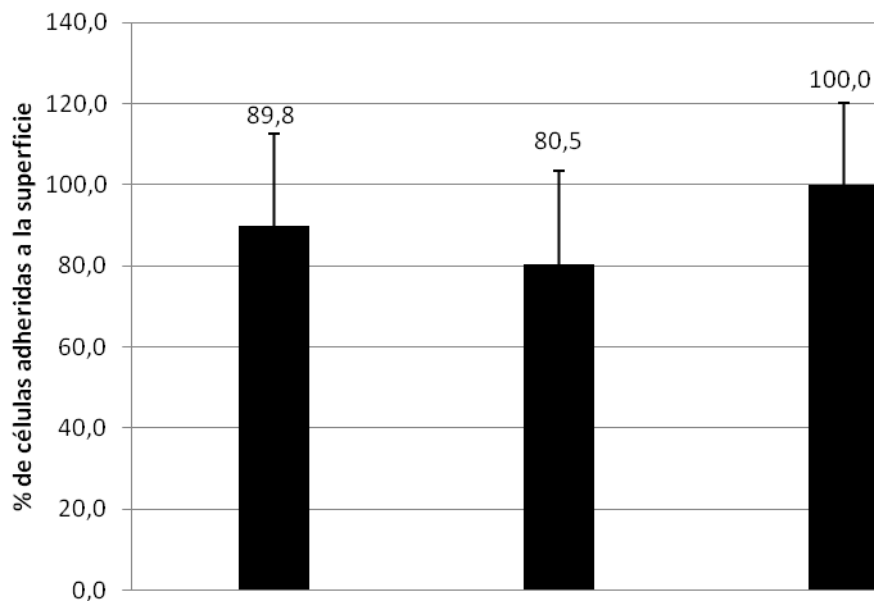


Fig. 2

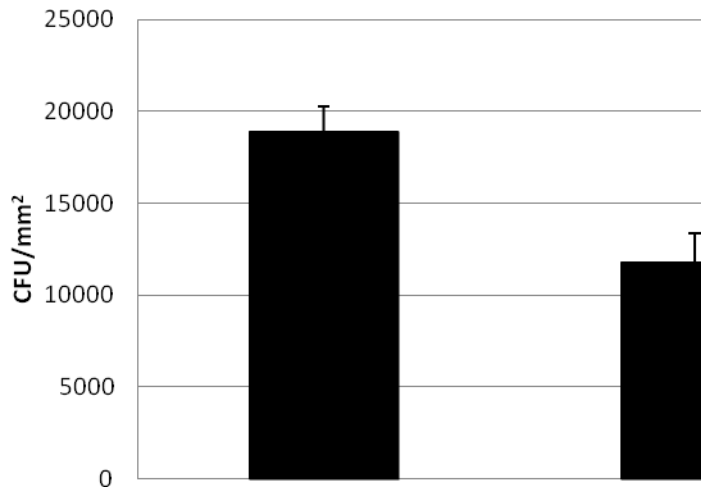


Fig. 3

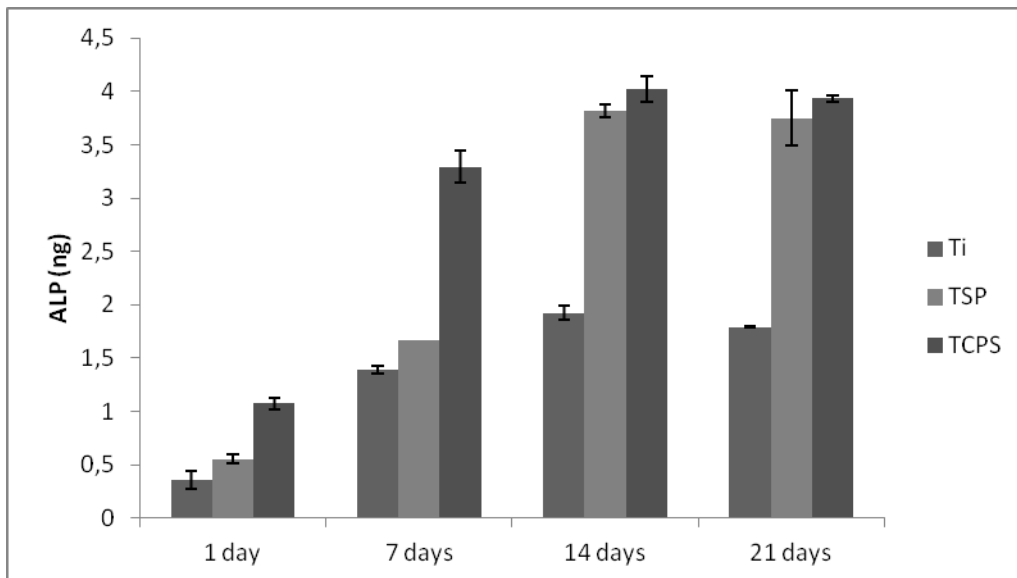


Fig. 4





- ②① N.º solicitud: 201331756  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2013  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X         | CN 102851656 A (GUANGDONG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 02.01.2013, (resumen), Chemical Abstracts [en línea] [recuperado el 18.02.2014]. Recuperado de: STN International, Columbus, Ohio (EE.UU.), Nº de acceso: 2013:27517.                                     | 1-3                        |
| Y         |   | 4-6                        |
| X         | G. LI et al., "Tailoring of the titanium surface by immobilization of heparin/fibronectin complexes for improving blood compatibility and endothelialization: An in vitro study", Biomacromolecules, 2011, vol. 12, nº 4, páginas 1155-1168, ver página 1157. | 1-3                        |
| Y         |   | 4-6                        |
| A         | G. LI et al., "Coimmobilization of heparin/fibronectin mixture on titanium surfaces and their blood compatibility", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, vol. 81, páginas 255-262.   | 1-6                        |
| A         | F. ZHANG et al., "Fabrication of biomolecule-PEG micropattern on titanium surface and its effects on platelet adhesion", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, vol. 102, páginas 457-465.   | 1-6                        |
| A         | Y. KU et al., "The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fibronectin and vitronectin on cell behavior", Biomaterials, 2005, vol. 26, páginas 5153-5157.  | 1-6                        |
| A         | A. CACCHIOLI et al., "Human vitronectin-derived peptide covalently grafted onto titanium surface improves osteogenic activity: A pilot in vivo study on rabbits", Tissue Engineering: Part A, 2009, vol. 15, nº 10, páginas 2917-2927.                        | 1-6                        |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
21.02.2014

Examinador  
E. Dávila Muro

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61L27/06** (2006.01)

**A61L27/54** (2006.01)

**C23C22/60** (2006.01)

**C23C22/73** (2006.01)

**C23C22/83** (2006.01)

**A61L33/12** (2006.01)

**A61L33/14** (2006.01)

**A61F2/02** (2006.01)

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

A61L, C23C, A61F

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

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NLP, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.02.2014

**Declaración**

|   |                      |           |
|---|----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 4-6 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-3 | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones     | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-6 | <b>NO</b> |

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

| Documento | Número Publicación o Identificación                                  | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01       | CN 102851656 A (GUANGDONG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY)                  | 02.01.2013        |
| D02       | G. LI et al., Biomacromolecules, 2011, vol. 12, nº 4, pgs 1155-1168. | 2011              |

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

La invención se refiere a un procedimiento de funcionalización de superficies de titanio caracterizado porque comprende sucesivas etapas de activación por tratamiento con una solución de NaOH, reacción con una solución de (trietoxisilil)propil anhídrido succínico (TESPSA), tratamiento con una solución de N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) y N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil carbodiimida (EDC) o 1-etil-3-(4-azonio-4,4-dimetilpentil) carbodiimida y unión covalente de una proteína (vitronectina, fibronectina), péptido o amino polietilenglicol a la superficie de titanio.

El documento D01 divulga un método para la funcionalización de superficies de titanio utilizables en implantes y para ingeniería de tejidos. El método divulgado supone el tratamiento de la superficie de titanio con una solución de NaOH 2-8M a 80°C y a continuación con una solución de un organosilano en tolueno a reflujo durante 2-12 horas, en particular se utilizan 3-aminopropiltriethoxisilano, (trietoxisilil)propil anhídrido succínico y  $\gamma$ -(2,3-epoxipropoxi)propiltrimetoxisilano. Se consigue la incorporación de grupos funcionales amino, hidroxilo y/o carboxilo al sustrato de titanio lo que permiten el posterior anclaje e inmovilización de biomoléculas sobre el mismo (ver resumen).

Teniendo en cuenta lo divulgado en el documento D01, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-3 no se considera nuevo ni con actividad inventiva según los artículos, 6.1 y 81. LP 11/1986.

El documento D02 divulga la funcionalización de superficies de titanio con una mezcla de heparina y fibronectina. El proceso supone el tratamiento del sustrato de titanio con una solución de NaOH 2,5M a 80°C durante 24 horas, lavado con agua desionizada y secado; a continuación tratamiento con una solución de aminopropiltriethoxisilano (APTE) en etanol al 2% (v/v) durante 10 horas a 37°C, seguido de lavado con etanol y agua desionizada y aplicación de ultrasonidos durante 5 minutos. El sustrato de titanio funcionalizado con grupos silano se hace reaccionar con una mezcla de heparina-fibronectina 1:1 a 37°C durante 2 horas con pre-activación con una disolución de EDC/NHS durante 1 hora (ver página 1157 y Figura 1).

La diferencia entre lo que divulga D02 y el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 4-6 es que en este caso la funcionalización del sustrato de titanio se hace utilizando un organosilano diferente, APTE en lugar de con TESPSA.

El problema técnico que plantea la solicitud radica en proporcionar un procedimiento de funcionalización de superficies de titanio alternativo a los descritos en el estado de la técnica y que permita obtener productos con propiedades mejoradas. La solución propuesta en la solicitud supone activar el sustrato de titanio mediante un tratamiento con NaOH y posterior reacción con TESPSA como agente de silanización que permita la incorporación posterior de biomoléculas sobre las superficies de titanio.

En el estado de la técnica anterior ya se encuentra divulgado el efecto que tiene utilizar TESPSA como agente de silanización para interaccionar con los grupos hidroxilo de una superficie de titanio activada previamente con NaOH, de forma que pueda a continuación enlazar covalentemente con biomoléculas (ver D01).

A la vista de lo divulgado en los documentos D01 y D02, resultaría obvio para un experto en la materia, sobre todo cuando se va a obtener el mismo resultado (superficies de titanio funcionalizadas para la inmovilización covalente de biomoléculas), utilizar TESPSA para la unión covalente de biomoléculas como en el procedimiento descrito en la invención, como reactivo de silanización alternativo al proceso de modificación de superficies de titanio descrito en D02. Las condiciones de reacción específicas en cada etapa se consideran dentro del alcance del conocimiento del experto en la materia y no difieren sustancialmente de lo divulgado en dichos documentos.

En consecuencia, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 4-6 se considera que no implican actividad inventiva y no satisfacen el criterio establecido en el artículo 8.1 LP 11/1986.