

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 419**

51 Int. Cl.:

C09D 4/00 (2006.01)

A61L 27/00 (2006.01)

C08L 51/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2007 E 07815059 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2032663**

54 Título: **Proceso de injerto de polímeros bioactivos en materiales protésicos**

30 Prioridad:

07.06.2006 FR 0605073

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

19.08.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS 13 (100.0%)
AVENUE JEAN-BAPTISTE CLÉMENT
93430 VILLETANEUSE, FR**

72 Inventor/es:

**MIGONNEY, VÉRONIQUE;
HELARY, GÉRARD y
NOIRCLERE, FLAVIE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 543 419 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

Proceso de injerto de polímeros bioactivos en materiales protésicos

La presente invención se refiere a procesos para injertar polímeros bioactivos en un material protésico, a los materiales que pueden obtenerse por este proceso y a las aplicaciones de estos últimos. Más específicamente, la invención se refiere a un proceso de injerto directo de polímeros en la superficie de materiales protésicos.

El implante de una prótesis en una ubicación ósea engendra una cascada de reacciones tejidos/implantes denominada "respuesta del hospedador" que, si se controla, permite dirigir con precisión la "osteointegración del implante". La osteointegración es la integración perfecta del implante en el hueso gracias a un contacto íntimo tejido óseo/prótesis y a una ausencia de tejidos fibrosos en la interfaz. Esta integración es necesaria para rehabilitar una función deficiente por medio de implantes óseos definitivos (prótesis articulares, implantes dentales). Sin embargo, estos procesos pueden verse afectados por muchos parámetros. Por una parte, las propiedades fisicoquímicas del material tales como la topografía de la superficie, la rugosidad, la composición química y la energía superficial, por otra parte la técnica quirúrgica y la presencia de gérmenes. Además, la presencia de tejido "fibro-inflamatorio" alrededor del implante, que no tiene ni las actividades biológicas ni las características mecánicas del tejido óseo, aumenta la susceptibilidad a un despegado aséptico (desconexión del implante) y la infección del sitio del implante.

Actualmente, para asegurar el anclaje de las prótesis totales de cadera en el hueso, comúnmente se utilizan dos enfoques: bien el implante metálico (eventualmente revestido de hidroxapatita) se ancla mecánicamente con fuerza en el hueso, o bien se fija con ayuda de un cemento basado en poli(metacrilato de metilo) (PMMA). Durante los últimos treinta años, los revestimientos de "hidroxapatita" han sido muy utilizados para mejorar la osteointegración de los implantes, porque permiten un buen anclaje óseo a la vez que ofrecen buenos rendimientos mecánicos en un tiempo relativamente corto.

Los biomateriales son materiales destinados a reemplazar todas o parte de las funciones que ya no pueden asegurarse por los tejidos, un órgano o una parte de un órgano deficientes. Por eso, los biomateriales implantables deben responder principalmente a dos criterios. En primer lugar deben poseer las propiedades mecánicas específicas necesarias para asegurar correctamente las funciones mecánicas de los tejidos o de los órganos defectuosos. Tampoco deben desencadenar una respuesta hostil del hospedador, es decir, deben ser "aceptados" e integrados por el hospedador de una manera controlada, dicho con otras palabras, deben ser "biointegrables".

Sin embargo, ningún material de síntesis actualmente implantado puede considerarse realmente como "biointegrable". En efecto, el material implantado es considerado como un "cuerpo extraño" por el sistema viviente y esto desencadena una serie de eventos agrupados bajo el término de respuesta inflamatoria, que si no se controla puede conducir entonces precisamente al rechazo del implante. Por lo demás, este material considerado como un "cuerpo extraño" aparece como un soporte privilegiado para la adhesión y la colonización de microorganismos tales como las bacterias. La adhesión de bacterias potencialmente infecciosas sobre los implantes biomédicos que están en la etapa inicial de la infección, representan por lo tanto un grave problema. Por otra parte, esta adhesión bacteriana en numerosos casos va seguida de la formación de una "biopelícula" que desempeña un papel de protección de las bacterias contra toda terapia y, en particular, contra los antibióticos. Por ejemplo, las infecciones por estafilococos después del implante de un biomaterial permanente (prótesis ortopédica) o incluso temporal (catéter) a menudo tienen consecuencias drásticas para los pacientes como septicemias, endocarditis u osteomielitis y su curación es extremadamente difícil o incluso imposible mientras el implante permanezca en su sitio. Así pues, se observan demasiado a menudo fenómenos de rechazo durante el implante de un biomaterial en un organismo vivo así como fenómenos de infección de los materiales implantados. Estas respuestas biológicas indeseables vis a vis del implante pueden conducir a una nueva intervención quirúrgica o incluso a la retirada del biomaterial implantado.

Por lo tanto, conviene optimizar las interacciones biomateriales/células en el caso de implantes articulares pero también en el caso de los implantes dentales y al mismo tiempo prevenir la infección de estos materiales controlando las interacciones biomateriales/bacterias.

Se han llevado a cabo investigación para mejorar la biocompatibilidad y la biointegración de los materiales utilizados como implantes y, en consecuencia, disminuir las respuestas hostiles del hospedador que conducen al rechazo del implante. Un enfoque de la investigación se refiere a la modificación de las superficies de los materiales protésicos, en particular la modificación de la superficie del titanio y sus aleaciones. Una de tales modificaciones tiene como objetivo favorecer la biointegración de los implantes en los tejidos óseos, a la vez que previene las infecciones.

Se ha descrito un proceso de injerto de polímeros por silanización. Este proceso permite funcionalizar las superficies hidroxiladas o ricas en NH_2 previamente al injerto de un polímero. En el caso del titanio, la silanización se ha utilizado principalmente para crear las interfaces metal-polímero. Los polímeros injertados pueden ser polímeros bioactivos, es decir, polímeros que son capaces de orientar las respuestas celulares eucariotas y/o procariotas, lo que significa que tales polímeros injertados favorecen la osteointegración de un implante protésico y previenen el desarrollo de una infección.

El protocolo de silanización utilizado por estos sustratos para la mayoría de los autores consiste en atacar

- químicamente la superficie de la muestra para favorecer la presencia de los grupos hidroxilo, a continuación sumergir la muestra en una disolución que contiene la molécula de silano. Las ventajas de estas reacciones son su simplicidad y su estabilidad, atribuidas a su enlace covalente y a su estructura de red. No obstante, la eficacia de la silanización depende de la concentración de grupos hidroxilo en la superficie del material, y esta técnica no permite
- 5 inmovilizar todos los polímeros, sino únicamente aquellos que poseen un grupo funcional compatible con uno situado en el extremo de la cadena del derivado de silano.
- Por lo tanto, la mayoría de los autores utilizan la silanización como una etapa intermedia del injerto posterior de una molécula bioactiva u orgánica. En el resto de esta solicitud, este proceso de injerto por silanización anterior se denominará "proceso de injerto indirecto".
- 10 Los presentes inventores han desarrollado un nuevo proceso de injerto de polímeros bioactivos sobre un material protésico.
- Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un proceso de injerto de polímeros bioactivos sobre un material protésico.
- 15 De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se refiere a materiales protésicos que pueden obtenerse por un proceso de este tipo.
- De acuerdo con un último aspecto, la invención se refiere a los implantes protésicos fabricados a partir de los materiales protésicos que pueden obtenerse por el proceso de la invención.
- 20 En el proceso de injerto de la presente invención, y a diferencia del proceso de injerto indirecto descrito anteriormente, no se utiliza ninguna molécula intermedia, tal como un derivado de silano, entre la superficie del material y el polímero que se va a injertar encima.
- Así pues, la invención tiene por objeto un proceso de injerto de polímeros bioactivos sobre un material protésico de titanio o de aleación de titanio que comprende las siguientes etapas:
- la generación de especies activas donadoras de radicales libres en la superficie del material protésico de titanio o de aleación de titanio por oxidación de dicho material protésico de titanio o de aleación de titanio;
 - 25 - la generación de radicales libres en la superficie del material protésico de titanio o de aleación de titanio por reacción térmica a una temperatura comprendida entre 40 y 100°C.
 - la colocación de dicho material protésico de titanio o de aleación de titanio sobre el que se generan los radicales libres en presencia de al menos un monómero portador de una función que permite una polimerización radicalaria, permitiendo la polimerización radicalaria de dicho monómero la formación de un polímero bioactivo,
 - 30 realizándose dicha polimerización radicalaria en ausencia de oxígeno.
- El proceso de acuerdo con la invención es un proceso directo, a diferencia del proceso indirecto descrito anteriormente, en cuanto a que los polímeros se forman directamente sobre el material protésico a partir de los monómeros que lo componen. En efecto, en el presente proceso, los radicales libres se forman directamente sobre el material protésico que luego se usa como iniciador de la reacción de polimerización.
- 35 Los inventores pudieron demostrar que un proceso directo de injerto de este tipo tiene muchas ventajas por comparación con el proceso de injerto indirecto. En particular, el proceso de acuerdo con la invención es más económico, más rápido y más eficaz que el método indirecto, especialmente en términos de cantidad de polímero fijado sobre el material protésico. Así pues, generalmente, el proceso de la presente invención permite obtener una densidad de injerto de 2 a 15 veces superior a aquella obtenida con el proceso de injerto indirecto por silanización de
- 40 la técnica anterior.
- Como se ha especificado anteriormente, el proceso de injerto de la presente invención está exento de toda etapa intermedia de injerto de una molécula intermedia entre el material protésico y el polímero injertado.
- En el sentido de la presente invención, un material protésico es un material que puede utilizarse en la fabricación de un implante médico tal como una prótesis, en particular una prótesis de cadera o una prótesis dental.
- 45 Los materiales modificados por el proceso de la presente invención corresponden más específicamente a cualquier material sobre cuya superficie pueden formarse los radicales libres por oxidación química, en particular por oxidación química ácida o por ozonación, y después calentamiento. Para esto, se pueden citar, en particular, los soportes metálicos, que incluyen titanio y sus aleaciones, en particular basadas en níquel, vanadio, aluminio y/o molibdeno, aluminio, tantalio, iridio, zirconio, oro y acero, de cerámica o incluso de vidrio. En un modo particular de realización
- 50 de la invención, el material protésico es un material protésico que no es polímero.
- Ventajosamente, el material protésico es titanio o una de sus aleaciones.
- El titanio se emplea comúnmente como material protésico porque es biocompatible. En efecto, el titanio es un

material de elección para los implantes ortopédicas o dentales debido a que sus propiedades mecánicas son bastante parecidas a las del hueso, su buena tolerancia debido a sus capacidades de osteointegración y/o a la ausencia de fenómenos alérgicos o de rechazo vis a vis del titanio.

5 Ventajosamente, el material protésico puede pulirse por abrasión antes de la formación de los radicales libres para superar los problemas de rugosidad de la superficie del material. Así pues, en un modo particular de realización de la invención, los materiales protésicos se pulen con papel abrasivo y, preferiblemente, con diferentes papeles abrasivos de granulometría decreciente. Más específicamente, el pulido mecánico de los materiales protésicos puede realizarse con ayuda de un brazo automático montado sobre una pulidora rotativa, con papel abrasivo de granulometrías decrecientes. Así pues, se pueden utilizar sucesivamente papeles abrasivos de grado 800, 1000 y después 1200. El material protésico también se puede lavar, preferiblemente a continuación del pulido, en particular en una disolución de acetona, y después preferiblemente se seca. Se puede utilizar directamente después de la etapa de pulido, lavado y/o secado, o se puede conservar en ausencia de oxígeno, preferiblemente en atmósfera inerte, tal como en argón o helio.

15 Ventajosamente, las especies activas donadoras de radicales libres se generan en la superficie del material protésico por oxidación, en particular por oxidación química. Se puede citar, en particular, una oxidación química por utilización de una mezcla ácido/H₂O₂, en particular H₂SO₄/H₂O₂, o una oxidación por ozonación. La oxidación química por utilización de una mezcla ácido/H₂O₂ se prefiere particularmente en el caso de la oxidación de materiales protésicos metálicos, en particular la utilización de una mezcla H₂SO₄/H₂O₂. Se pueden utilizar igualmente otros ácidos para formar peróxidos en la superficie del material protésico, en particular ácido fluorhídrico o ácido clorhídrico, siempre mezclado con H₂O₂.

25 Por "mezcla ácido/H₂O₂" se entiende la mezcla simultánea o secuencial de las disoluciones, es decir, la disolución de ácido y la disolución de H₂O₂. Así pues, bien las dos disoluciones se ponen en contacto simultáneamente con el material protésico que se va a oxidar, bien la disolución de ácido se pone en contacto en un primer momento, y después la disolución de H₂O₂ se pone en contacto en un segundo momento con el material protésico. En todos los casos, el tiempo de oxidación puede variar en gran medida y el experto en la materia lo podrá adaptar en función del material protésico que se va a tratar, el modo de oxidación química que se utiliza para formar de las especies donadoras de radicales libres en la superficie de este material y la densidad del injerto deseada. El experto en la materia podrá determinar, en particular, el mejor modo operativo para medir la tasa de injerto obtenida después de haber injertado los polímeros sobre el material protésico oxidado que se va a ensayar, en particular por dosificación de la densidad de injerto con azul de toluidina (véase el ejemplo 1.5).

30 En el caso de una mezcla de oxidación ácido/H₂O₂ simultánea, preferiblemente el tiempo de oxidación es preferiblemente de 1 a 10 minutos, de manera más preferida de 3 a 6 minutos y de la manera más preferida el tiempo de oxidación es de 5 minutos. Preferiblemente, este tiempo de oxidación se aplica a la oxidación del titanio o de una de sus aleaciones con una disolución H₂SO₄/H₂O₂.

35 En el caso de la utilización de una mezcla secuencial, el material protésico, por ejemplo, puede sumergirse en la disolución de ácido durante al menos 10 segundos, preferiblemente durante al menos 20 segundos, preferiblemente durante al menos 30 segundos, de manera más preferida durante más de 50 segundos, de manera preferida durante más de 1 minuto, de manera preferida durante más de 2 minutos, de manera preferida durante más de 3 minutos, de manera preferida durante más de 4 minutos. Este tiempo de colocación del titanio, o de una de sus aleaciones, en presencia de H₂SO₄ puede ser muy superior y, por ejemplo, puede alcanzar 30 minutos o más. Sin embargo, en un modo preferido de realización, el tiempo de colocación del material protésico en presencia de la disolución de ácido es inferior o igual a 5 minutos, tiempo más allá del cual se observa una disminución de la tasa de injerto. Este procedimiento se aplica en particular en el caso de la oxidación del titanio o de una de sus aleaciones, puesta en presencia de una disolución de H₂SO₄.

45 De la misma manera, el tiempo que el material protésico se pone en presencia de la disolución de H₂O₂ puede variar. Preferiblemente, el material protésico, preferiblemente el titanio o una de sus aleaciones, se pone en presencia de H₂O₂ durante al menos 10 segundos, preferiblemente al menos 20 segundos, preferiblemente al menos 30 segundos, preferiblemente al menos 40 segundos, preferiblemente al menos 50 segundos, preferiblemente al menos 1 minuto, preferiblemente al menos 2 minutos, preferiblemente durante 2 a 3 minutos, y de la manera más preferida durante dos minutos después de añadir la disolución de H₂O₂. En un modo preferido de realización, se prefiere una acción del H₂SO₄ sobre el titanio, o una de sus aleaciones, durante 1 minuto y después una acción del H₂O₂ sobre el titanio durante 2 minutos.

55 La puesta en contacto del material protésico con la disolución de ácido y/o la disolución de H₂O₂ puede realizarse por cualquier medio conocido por sí mismo. Así pues, por ejemplo, las disoluciones pueden verterse en un recipiente que contiene el material protésico, o el material protésico se puede sumergir en un recipiente que contiene la/las disolución/disoluciones.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los inventores piensan que el tratamiento por una disolución ácida permite eliminar la capa de óxido nativo que se forma espontáneamente sobre los materiales protésicos en presencia de aire, por ataque químico. El peróxido de hidrógeno permite crear hidroperóxidos en la superficie del material

protésico, en particular hidroperóxidos de titanio (TiOOH) en el caso de la utilización del titanio como material protésico. Estos hidroperóxidos, donadores de radicales libres cuando se calientan, pueden servir entonces de iniciadores de la polimerización radicalaria de los monómeros sobre el material protésico, en particular sobre el titanio.

- 5 La proporción de ácido respecto a H_2O_2 puede variar en gran medida y el experto en la materia es capaz de definir, sobre la base de la presente descripción, la razón más eficaz para conducir a una tasa de injerto deseada.

Preferiblemente, se utiliza una disolución H_2SO_4/H_2O_2 50/50 (v/v) para oxidar el material protésico. La temperatura utilizada es generalmente la temperatura ambiente (20-30°C), incluso una temperatura más baja (por ejemplo, entre 0 y 20°C), puesto que la reacción de oxidación puede ser exotérmica.

- 10 Ventajosamente, se añaden sales metálicas (hierro, níquel, cromo, cobre) durante de la etapa de generación de las especies activas donadoras de radicales libres. Estas sales metálicas se añaden, en particular, a la mezcla ácido/ H_2O_2 . La concentración de estas sales puede variar en gran medida. En particular, la concentración varía de 10^{-4} mol/l a 2 mol/l. Favorecen la formación en concentración más importante de peróxido en la superficie del material protésico, en particular del titanio o de una de sus aleaciones, aumentando así el grado de injerto.
- 15 Por ejemplo, se puede añadir ventajosamente a la mezcla ácido/ H_2O_2 sales basadas en hierro, níquel, cromo o cobre, como por ejemplo el sulfato de hierro ($FeSO_4$), el acetato de hierro ($Fe(C_2H_3O_2)_2$), el bromuro de hierro ($FeBr_3$), el yoduro de hierro (FeI_2), el nitrato de hierro ($Fe(NO_3)_3$), el tiocianato de hierro ($Fe(SCN)_2$, $Fe(SCN)_3$, $Fe_2(SCN)_6$, ... Preferiblemente, se añade sulfato de hierro a la mezcla ácido/ H_2O_2 .

- 20 Ventajosamente, se realiza una etapa de obtención de radicales libres a partir de las especies activas generadas previamente en la superficie del material, en particular por reacción térmica de las especies activas generadas. Más específicamente, la reacción térmica se realiza a una temperatura comprendida entre 25 y 160°C, preferiblemente entre 40 y 100°C, de manera incluso más preferida entre 50 y 80°C, de manera más preferida entre 60 y 75°C y de la manera más preferida a 70°C.

- 25 La etapa de producción de radicales libres puede realizarse antes de, preferiblemente durante o después de la etapa de puesta en contacto de los monómeros con el material sobre el que se han generado las especies activas.

Así pues, en un modo de realización particular, el proceso de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

- se generan especies activas sobre un material protésico tal como se ha definido anteriormente;
 - se generan radicales libres, en particular por calentamiento entre 40°C y 100°C; y
- 30 - el material protésico sobre el que se generan los radicales libres se pone en presencia de al menos un monómero portador de una función que permite una polimerización radicalaria, polimerización radicalaria que permite la formación de un polímero bioactivo, en ausencia de oxígeno.

- De acuerdo con otro modo de realización, las especies activas se generan, en primer lugar, sobre el material que después se pone en contacto con los monómeros y en condiciones que permiten la formación de los radicales libres a partir de las especies activas, en particular por calentamiento de la disolución de monómeros.
- 35

En otro modo de realización particular de la invención, las especies activas se generan en primer lugar sobre el material que después se pone en contacto con una disolución de monómeros, formándose entonces los radicales libres, en particular por calentamiento de la disolución de monómeros.

- 40 Los monómeros utilizados en el presente proceso se injertan ventajosamente sobre los soportes mencionados anteriormente por medio de una reacción de polimerización radicalaria. Esta última se inicia por los radicales libres generados directamente sobre el soporte que se va a injertar.

- Los monómeros utilizados en el proceso de acuerdo con la invención comprenden al menos un grupo que permite la polimerización. Ventajosamente, los monómeros comprenden al menos una insaturación alifática, preferiblemente un grupo vinílico, que permite la polimerización. Por monómeros que presentan al menos una insaturación alifática, se entiende de acuerdo con la invención monómeros que presentan uno o dos, preferiblemente un, doble o triple enlace, ventajosamente un doble enlace $-CH=CH-$.
- 45

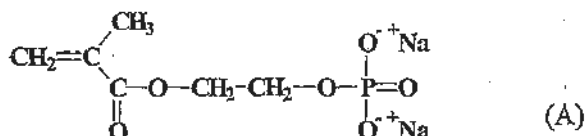
Una ventaja del proceso de la presente invención respecto al proceso indirecto descrito anteriormente se sustenta en la posibilidad de injertar una gran variedad de polímeros. En efecto, puede utilizarse en la presente invención cualquier monómero susceptible de ser polimerizado por una reacción de polimerización radicalaria.

- 50 La estructura de los monómeros utilizados en la presente invención permite la formación de un polímero bioactivo en la superficie de un material protésico. En el sentido de la invención, un polímero es bioactivo si es capaz de orientar las respuestas celulares eucariotas y/o procariotas en el sitio de integración del implante protésico fabricado a partir de un material protésico que puede obtenerse de acuerdo con el proceso de la presente invención, es decir, si es capaz favorecer la osteointegración del implante protésico y de prevenir el desarrollo de una infección.

Con el fin de mejorar las propiedades de osteointegración y anti-bacterianas de los materiales mencionados anteriormente, los monómeros utilizados en el marco del presente proceso comprenden ventajosamente un grupo sulfonato y/o carboxilato. En efecto, se ha demostrado recientemente que los polímeros portadores de grupos iónicos sulfonato y/o carboxilato favorecen la adherencia, la colonización y la diferenciación de los osteoblastos.

Además, se ha demostrado también que los polímeros portadores de estos mismos grupos, pero más incluso cuando son portadores solo de los grupos sulfonato, permiten inhibir la adherencia de cepas bacterianas, en particular de *Staphylococcus aureus*, cepa implicada mayoritariamente en las infecciones sobre materiales protésicos.

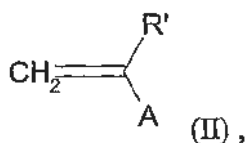
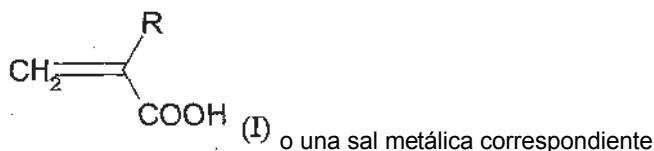
Se puede considerar igualmente injertar los grupos osídicos (glucosa, sacarosa, fructosa, poliosa,...) o incluso los grupos fosfatos de tipo -O-PO-(OH)₂, en particular de fórmula (A):



Preferiblemente, los polímeros formados sobre los materiales protésicos por el proceso de acuerdo con la invención se forman a partir de al menos uno de los siguientes monómeros: ácido acrílico, ácido metacrílico, metacrilato de metilo (MMA), acrilamida de N-(sulfonato de fenil sodio) (NaAS), metacrilamida de N-(sulfonato de fenil sodio) (NaMS), estireno sulfonato de sodio (NaSS), metacrilato fosfato de etilenglicol, metacrilato di-, isopropilideno, monómeros portadores de grupos osídicos o sea tales como, por ejemplo, glucosa, glucofurano, sacarosa, poliosa, fructosa, etc.

Los polímeros injertados obtenidos pueden ser homopolímeros o copolímeros. Así pues, en un modo particular de realización de la invención, los homopolímeros injertados se forman a partir de estireno sulfonato de sodio (injerto de poliNaSS) o a partir de metacrilato de metilo (injerto de poli (metacrilato de metilo), o PMMA).

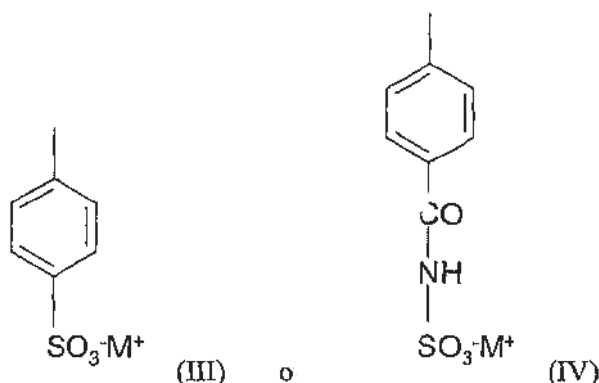
En un modo particular de realización de la invención, los polímeros susceptibles de ser injertados por el proceso de acuerdo con la invención son copolímeros obtenidos por polimerización radicalaria de monómeros que comprenden al menos un monómero de fórmula general (I) y al menos un monómero de fórmula general (II), siendo las fórmulas (I) y (II) las siguientes:



en las que R y R', iguales o diferentes, representan un átomo de hidrógeno o un radical alquilo de C₁ a C₆, lineal o ramificado, y A representa un radical de tipo arilsulfonato o ácido correspondiente.

De acuerdo con una variante del proceso del proceso de acuerdo con la invención, los monómeros de fórmula (I) pueden presentar al principio funciones éster, hidrolizándose entonces los copolímeros obtenidos de esta manera (parcial o totalmente), para obtener las funciones ácido correspondientes.

Más específicamente, A se elige de los radicales de las siguientes fórmulas:



en las que M representa un ión metálico, preferiblemente un metal alcalino.

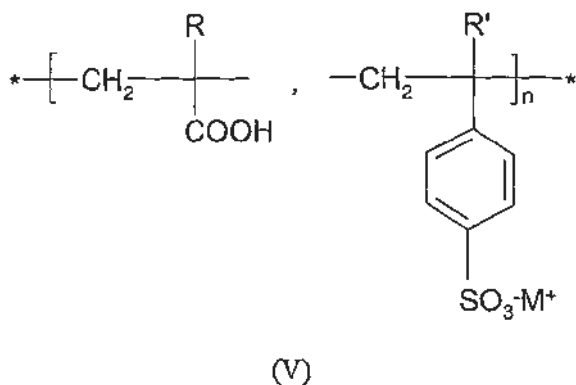
El metal alcalino se elige preferiblemente de sodio y potasio, ventajosamente sodio.

5 Entre los radicales alquilo de C₁ a C₆, lineales o ramificados, se pueden citar, en particular, los radicales metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo o t-butilo, pentilo, y hexilo.

Entre los monómeros de fórmula (I), se pueden citar, en particular, ácido acrílico (AA), ácido metacrílico (MA), ácido etacrílico (EA), sus sales correspondientes (en particular sales de metal alcalino, preferiblemente de sodio) y sus mezclas. Se prefiere el ácido metacrílico.

10 Entre los monómeros de fórmula (II), se pueden citar, en particular, acrilamida de N-(sulfonato de fenil sodio) (NaAS), metacrilamida de N-(sulfonato de fenil sodio) (NaMS), estireno sulfonato de sodio (NaSS) y sus mezclas. Se prefiere el estireno sulfonato de sodio.

Como ilustración, cuando A del monómero de fórmula (II) presenta la fórmula (III), el copolímero injertado sobre el material protésico puede estar representado más específicamente por la siguiente fórmula general (V):



15 en la que R, R', y M son tal como se han definido anteriormente, y n representa un número real comprendido entre 10 y 1000.

La prima significa que la cantidad, la razón y el encadenamiento de las unidades monoméricas presentes en los copolímeros varían. Esta variación está relacionada directamente con los parámetros del proceso de polimerización, tales como por ejemplo la cantidad de cada monómero que se utiliza.

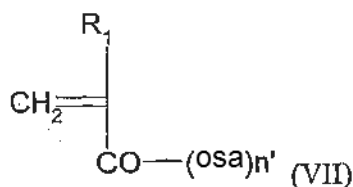
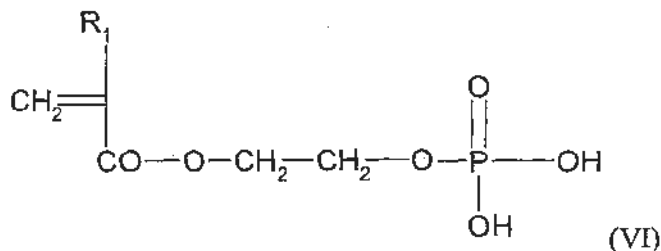
20 Los pesos moleculares de los polímeros injertados de acuerdo con el proceso de la presente la invención pueden variar en gran medida y se eligen o se controlan por el experto en la materia en función de su aplicación o uso posterior. Para dar un orden de magnitud, el peso molecular promedio en peso puede variar de 1 000 a 100 000 daltons.

25 Para esto, las cantidades de los monómeros de fórmulas (I) y (II) pueden variar en gran medida y dependen en particular de las propiedades deseadas para los copolímeros. Preferiblemente, la razón molar de (I) sobre (II) varía de 90/10 a 10/90, ventajosamente de 80/20 a 20/80. Los copolímeros de acuerdo con la invención presentan en particular las siguientes fracciones molares de (I) sobre (II): 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80 y 10/90 (estas fracciones corresponden en realidad a las fracciones de los monómeros introducidos, variando las fracciones de los monómeros incorporados en los copolímeros obtenidos por análisis RMN un máximo de ± 2 respecto a aquellas mencionadas anteriormente).

30

5 Los copolímeros injertados de acuerdo con el proceso de la presente invención pueden obtenerse por polimerización radicalaria de monómeros que comprenden, además de los monómeros de fórmulas (I) y (II), otros monómeros que presentan al menos una insaturación alifática. Los otros monómeros que presentan al menos una insaturación alifática pueden ser de cualquier naturaleza, incluyendo los monómeros que dan un carácter hidrosoluble o no a los polímeros injertados. Preferiblemente, los monómeros adicionales son de naturaleza hidrosoluble, tales como los monómeros que presentan un radical de tipo azúcar o fosfato.

Se pueden citar como monómeros adicionales, los monómeros de las siguientes fórmulas:



10 en las que R_1 , iguales o diferentes, representa un átomo de hidrógeno o un radical alquilo de C_1 a C_6 , lineal o ramificado, tal como se ha definido anteriormente, y n' representa un número real comprendido entre 10 y 1000: Entre los grupos osa de la fórmula (VII), se pueden citar, en particular, glucosa, galactosa y sacarosa.

Para preservar las características de los polímeros injertados, el experto en la materia puede determinar por sí mismo, por manipulaciones rutinarias, los monómeros adicionales posibles y en qué cantidades.

15 Más particularmente y para dar un orden de magnitud, la cantidad de los monómeros de fórmula (I) y (II) es ventajosamente superior o igual al 25%, preferiblemente superior o igual al 50% en moles respecto al número total de moles de las unidades monoméricas presentes en los polímeros.

De acuerdo con un aspecto particular de la invención, los copolímeros se pueden obtener por polimerización radicalaria de los monómeros de fórmula (I) y (II) únicamente.

20 El tiempo de injerto puede variar en gran medida. El experto en la materia es capaz de elegir el tiempo necesario para la polimerización sobre el material protésico en función de la naturaleza de este último, del polímero que se va a injertar y de la densidad de injerto deseada. El experto en la materia puede seleccionar el tiempo más adecuado para medir la densidad de injerto con azul de toluidina (véase el ejemplo 1.5).

25 Ventajosamente, el material protésico se pone en contacto con el(los) monómero(s) durante al menos aproximadamente 30 minutos, y preferiblemente entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 48 horas. De manera más preferida, el material protésico se pone en contacto el(los) monómero(s) durante más de 2 horas, preferiblemente más de 3 horas, preferiblemente más de 5 horas, preferiblemente más de 8 horas, y preferiblemente durante aproximadamente 15 horas.

En un modo preferido de realización, la invención se refiere a un proceso para injertar poliNaSS sobre titanio que comprende las siguientes etapas:

- 30
- se generan especies activas donadoras de radicales libres en la superficie del titanio; y
 - el titanio sobre el que se generan las especies activas se pone en presencia de NaSS a una temperatura comprendida entre 40 y 100°C, durante al menos 8 horas, en ausencia de oxígeno.

En un modo particularmente preferido de realización, la invención se refiere a un proceso para injertar poliNaSS sobre titanio que comprende las siguientes etapas:

- 35
- se generan especies activas donadoras de radicales libres en la superficie del titanio; y
 - el titanio sobre el que se generan las especies activas se pone en presencia de NaSS a una temperatura de 70°C, durante 15 horas, en ausencia de oxígeno.

La reacción de polimerización radicalaria debe ocurrir en ausencia de oxígeno, siendo este un inhibidor de la reacción. Preferiblemente, la reacción se realiza en ausencia de oxígeno, en atmósfera inerte, en particular en argón, helio o nitrógeno, ventajosamente en atmósfera de nitrógeno.

5 Después de la polimerización, el material injertado de esta manera se recupera, y eventualmente se enjuaga, en particular con agua (por ejemplo agua destilada), en particular para eliminar los polímeros formados pero no injertados.

Otro objeto de la invención se refiere a los materiales protésicos injertados con los polímeros bioactivos que pueden obtenerse de acuerdo con el proceso descrito anteriormente.

10 La invención se refiere igualmente a la utilización de un material protésico de acuerdo con la invención para la fabricación de un implante protésico, en particular para la fabricación de una prótesis articular o de una prótesis dental.

Un objeto complementario de la invención se refiere a los implantes protésicos fabricados a partir de los materiales protésicos que pueden obtenerse por el proceso descrito anteriormente.

15 Las ventajas de la presente invención se detallan ahora en los siguientes ejemplos, y eventualmente a la luz de las figuras adjuntas.

Leyenda de las figuras

Figura 1: diagrama que representa el procedimiento de injerto de NaSS directo de acuerdo con la invención.

Figura 2: gráfico que representa el espectro IR de la superficie de titanio oxidado químicamente y después injertado con poliNaSS.

20 **Figura 3A:** desconvolución de los elementos carbono C1s (a la izquierda) y oxígeno O1s (a la derecha) del titanio oxidado químicamente.

Figura 3B: desconvolución de los elementos carbono C1s (a la izquierda) y oxígeno O1s (a la derecha) del titanio injertado con poliNaSS.

25 **Figura 3C:** desconvolución de los elementos titanio Ti2p (a la izquierda) y azufre S2p (a la derecha) del titanio oxidado químicamente.

Figura 3D: desconvolución de los elementos titanio Ti2p (a la izquierda) y azufre S2p (a la derecha) del titanio injertado con poliNaSS.

Figura 3E: comparación de las desconvoluciones del elemento azufre S2p del titanio oxidado químicamente (a la izquierda) y del titanio injertado con poliNaSS (a la derecha).

30 **Figura 4:** vistas en sección de la superficie ósea recién formada alrededor de los implantes. *S100/OC: 100% sulfonato y 0% carboxilato; C100/SO 100% carboxilato y 0% sulfonato.*

Ejemplos

Ejemplo 1: Injerto de polímero bioactivo en la superficie de cilindros de titanio

35 La primera etapa fue la colocación en el punto de injerto de los grupos iónicos. Por razones de simplificación, se ha elegido en un primer momento injertar únicamente los grupos arilsulfonato. La funcionalización se realizó sobre discos de titanio (99,7% de pureza) previamente pulidos para superar los problemas de rugosidad.

El injerto de los grupos arilsulfonato en la superficie del titanio se realiza directamente por creación de radicales libres por oxidación química que después se utilizan como iniciadores de la polimerización de un monómero portador de las funciones arilsulfonato.

40 La molécula de monómero es estireno sulfonato de sodio (NaSS). El procedimiento adoptado se resume en su conjunto en la figura 1.

1.1. Características del titanio

45 El titanio (*empresa Alfa Aesar*) se presenta en forma de barras extruidas de 12,7 mm de diámetro, que se han sometido a un recocido de alivio de tensiones de 30 min a 700°C. Su pureza (Tabla 1) es del 99,7% de la composición nominal (grado 1, o T40).

Tabla 1 Composición química del titanio puro utilizado

Elemento	C	N	O	H	Fe	Ti
% atómico	0,006	0,005	0,14	0,0014	0,08	99,7676

5 Todos los estudios se han realizado sobre discos de 2 mm de espesor, obtenidos por corte por electroerosión en un baño de agua realizado por la empresa Prestasem (Champagne sur Seine, Francia 77). Este modo de corte presenta la ventaja de evitar un endurecimiento demasiado importante del material y una pérdida de material demasiado grande, respecto a un mecanizado en el torno, por ejemplo.

1.2. Pulido del titanio

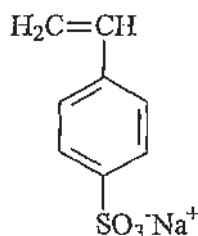
10 El pulido mecánico de los discos se realiza con ayuda de un brazo automático, montado sobre una pulidora rotativa, con papel abrasivo de granulometrías decrecientes (*Struers*). Un primer pulido con un papel de grado 800 (granos de 22 μm) elimina aproximadamente $1/10^{\text{e}}$ de mm de espesor, lo que tiene por efecto retirar el espesor de metal dañado por las picaduras debidas al modo de corte por electroerosión (arco eléctrico).

15 El pulido se refina después mediante la utilización de papeles de granulometrías cada vez más bajas (papeles 1000, y después 1200). El protocolo utilizado es el siguiente: 8 min con P800, 4 min con P1000, 4 min con P1200 (granos de 14 μm). Se obtiene una superficie de rugosidad equivalente a aquella que se utiliza comúnmente en la literatura para los estudios de comportamiento celular.

Después del pulido, las muestras se lavan con una disolución de acetona pura con ultrasonidos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se secan y se utilizan inmediatamente, o se conservan en argón (caja de manipulación con guantes).

1.3. Purificación del monómero NaSS

20 El monómero utilizado para aportar los grupos iónicos adecuados a la superficie del titanio es el estireno sulfonato de sodio (NaSS, sal sódica del ácido 4-vinilbencenosulfónico, Aldrich), monómero vinílico cuya fórmula química está representada a continuación



Molécula de Estireno Sulfonato de Sodio

25 El estireno sulfonato de sodio se purifica por recristalización. Este procedimiento consiste en disolver una masa m de monómero en una mezcla agua/etanol en proporción 10/90 a una temperatura de 60-70°C. La disolución se filtra después en caliente, a vacío de columna de agua. La disolución filtrada de esta manera se pone a 4°C durante 24 h. Los cristales formados se recuperan por filtración a vacío, a continuación se secan a 60-70°C a vacío.

1.4. Oxidación e injerto

30 La funcionalización se realiza en atmósfera controlada de argón (caja de manipulación con guantes) y se puede resumir de la siguiente manera:

1. Limpieza de las superficies de titanio pulidas;
2. Formación de radicales de peróxido en la superficie de los discos de titanio por humedecimiento de las muestras en una mezcla H_2SO_4 (*Acros*)/ H_2O_2 (*Aldrich*) 50/50 a temperatura ambiente. Los dos reactivos se vierten simultáneamente en el vaso de precipitados que contiene las muestras, y el conjunto se agita durante 35 2 minutos. La reacción es inmediata, fuertemente exotérmica y va acompañada de una liberación de gases. La disolución de oxidación inicialmente incolora vira a amarillo, naranja, y después a rojo ladrillo (lo cual se debe a la reacción del ácido sulfúrico sobre el titanio y la formación de iones Ti^{4+}).
3. Enjuagues múltiples de las superficies oxidadas con agua destilada;
- 40 4. Inmersión de las muestras en una disolución acuosa de monómero NaSS a una concentración de 0,7 M;

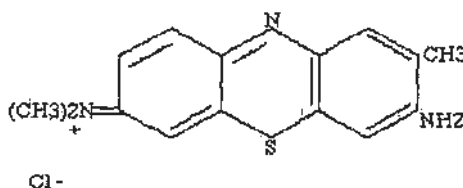
5. Calentamiento a 70°C de la disolución de monómeros en contacto con las muestras de titanio durante 14 h. El calentamiento a 70°C permite la ruptura del enlace peróxido (O-O) en radicales libres $TiO\bullet$, que servirán para iniciar la polimerización radicalaria de los monómeros vinílicos;

6. Enjuague de las superficies metálicas injertadas de poliNaSS con agua destilada para eliminar el homopolímero formado en disolución, susceptible de mezclarse con las cadenas de polímero injertadas.

1.5. Caracterización química y físico-química

a) Dosificación de la densidad de injerto con azul de toluidina

La "dosificación con azul de toluidina" es una técnica colorimétrica que utiliza como molécula cromófora el azul de toluidina que absorbe en el visible a 633 nm. Esta molécula tiene la particularidad de complejarse, a través de su grupo $N^+(CH_3)_2$, con los grupos aniónicos ($-COO^-$). Un mol de azul de toluidina se compleja con un mol de grupo carboxilato. Por lo tanto, la dosificación de azul de toluidina da la cantidad de monómero injertado. Esta propiedad se ha trasladado al NaSS, que puede complejarse en el grupo $N^+(CH_3)_2$ a través de su grupo sulfonato ($-SO_3^-$).



Las muestras de titanio injertadas se ponen en contacto con una disolución de azul de toluidina a $5 \cdot 10^{-4}$ M (ajustada a pH 10) a una temperatura de 30°C durante 6 horas. Esta etapa corresponde a la complejación del azul de toluidina en las unidades de monómeros de poliNaSS injertados. Las muestras se enjuagan después abundantemente con una disolución de hidróxido de sodio $1 \cdot 10^{-4}$ M, para eliminar el azul de toluidina no complejado. Se detienen los enjuagues cuando la disolución se hace incolora.

El azul de toluidina complejado se descompleja después mediante una disolución de ácido acético al 50% (*Acros organics*) que se deja en contacto con las muestras de titanio durante 24 h.

La disolución obtenida se ensaya por espectrofotometría con ayuda de un espectrofotómetro de tipo Safas Xenius guiado por su software. El coeficiente de extinción molar ϵ del azul de toluidina es igual a $51230 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

A partir de la concentración calculada se calcula la cantidad de moléculas injertadas a partir de la siguiente ecuación:

$$m = [\text{Monómero}] \times V \times M_{\text{monómero}} \text{ (en g)}$$

siendo V = volumen de la disolución dosificada ($5 \cdot 10^{-3}$ l)

$M_{\text{monómero}}$ = masa molar del monómero NaSS

La superficie de una pastilla medía 1 cm^2 , por lo tanto esta masa de monómero injertado puede expresarse como cantidad de materia injertada en g/cm^2 para una cara de la pastilla. La densidad óptica medida da una cantidad de moléculas injertadas de $10 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$ aproximadamente.

Las muestras ensayadas se vuelven a lavar después muchas veces con agua y su complejación con azul de toluidina se ensayó hasta cuatro veces. La densidad de injerto medida se reduce entonces a $3 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$, y se estabiliza a este valor. El fenómeno expuesto anteriormente puede explicar esta observación: en efecto, la complejación con azul de toluidina puede impulsar una distorsión de las cadenas de polímero y los múltiples lavados efectuados permiten evacuar las cadenas enmarañadas pero no realmente injertadas.

La densidad de injerto obtenida con el proceso de acuerdo con la invención es una densidad extremadamente importante porque los valores obtenidos en la literatura con el proceso indirecto por silanización son más bien del orden de $0,1$ a $0,2 \text{ } \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

b) Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflexión Total Atenuada (ATR/FTIR)

Se ha utilizado la espectroscopía FTIR en modo de reflexión total atenuada (ATR) para analizar la superficie de las muestras de titanio. El espectrofotómetro FTIR utilizado para realizar las mediciones es un aparato Nicolet, Avatar 370-FT-IR. Las muestras se analizan en modo ATR. Para las mediciones, las longitudes de onda oscilan entre 4000 y 650 cm^{-1} , a un ritmo 4 cm^{-1} , con una resolución de 1 cm^{-1} . Las muestras de titanio, oxidadas o no, injertadas o no, se aplican con una fuerza calibrada contra el cristal, para asegurar un contacto máximo entre la muestra y el diamante; se acumulan 120 adquisiciones por punto, para limitar el ruido de fondo al máximo. El fondo se toma sobre la atmósfera.

La tabla 2 a continuación resume las principales bandas de absorción características del poliNaSS y sus atribuciones a los diferentes grupos químicos.

Tabla 2: Bandas de absorción IR características del poliNaSS

Frecuencia (cm ⁻¹)	Aspecto del (o de los) pico(s)	Atribución
1640-1600 y 1496-1433	Bajo	ν (C=C) del núcleo aromático
1410	Medio	ν (SO ₂)
1180-1127	Fuerte	SO ₃ ⁻ Na ⁺ (sal)
1040	Fuerte	ν (O=S=O)
1009	Fuerte	núcleo aromático

- 5 Los picos característicos de las vibraciones del grupo sulfona O=S=O y del núcleo aromático de la molécula de NaSS constituyen un doblete situado a 1009-1040 cm⁻¹; los picos situados hacia 1127 y 1180 cm⁻¹ son atribuibles a la absorción de la sal de ácido sulfónico. La vibración de valencia antisimétrica del grupo SO₂ corresponde al pico a 1410 cm⁻¹, y se observa un saliente del pico precedente hacia 1220 cm⁻¹, que corresponde a la vibración de valencia simétrica del grupo SO₂. Respecto a la serie de picos entre 1640 y 1430 cm⁻¹, puede atribuirse a las vibraciones de valencia de los enlaces (>C=C<) del núcleo bencénico.

10 El espectro infrarrojo de la superficie de titanio oxidada químicamente e injertada de este mismo producto se presenta en la figura 2.

15 La presencia de poliNaSS sobre esta superficie se confirma especialmente por los dos picos característicos a 1008 y 1040 cm⁻¹. Se encuentra también la absorción de la sal de ácido sulfónico hacia 1127-1180 cm⁻¹. Por otra parte, las vibraciones de valencia del grupo SO₂ y de los dobles enlaces C=C del núcleo aromático se difuminan en el ruido de fondo, en vista de la diferencia de intensidades entre el producto puro de poliNaSS en forma de polvo y el producto injertado sobre la superficie.

c) Análisis químico por espectroscopía de los fotoelectrones (XPS)

20 Las muestras se analizaron con un espectrómetro Escalab VG 220i-XL. Los rayos X se producen por una fuente monocromática AlK α de 1486,6 eV.

Las muestras se introducen cuatro por cuatro en la cámara de análisis, que se bombea a vacío ultra-alto (10⁻⁹ a 10⁻¹⁰ mbar). El ángulo de emisión utilizado es de 45°, para una profundidad de análisis de la superficie de 10 nm en plena profundidad (estando situado el detector perpendicular respecto a la muestra). El diámetro de la punta de la muestra es de 150 a 200 μ m (potencia de aproximadamente 70 W, haz incidente 10 kV).

25 El análisis de cada muestra comienza por la adquisición de un espectro global que barre toda el área de las energías de enlace, para identificar los principales elementos químicos presentes en la superficie de la muestra, y cada uno de los cuales se analizará después más finamente. La resolución de energía dada es de \pm 0,1 eV.

30 En lo que se refiere al análisis de las muestras simplemente oxidadas, los elementos principales son carbono, oxígeno, y titanio; para las muestras injertadas, también se detallan el azufre y el sodio (NaSS). Las desconvoluciones se realizan con el software Elipse, proporcionado por VG; la referencia se toma sobre el pico principal de la contribución C_{1s} del carbono, que se fija a una energía de enlace de 284,8 eV.

En la tabla 3 se presenta la composición química de las superficies de titanio oxidado químicamente e injertadas.

Tabla 3: composición química de las superficies de titanio

% atómicos \pm DT	C	O	Ti	S	Na	Contaminantes
Control de Ti poli P1200	33,2 \pm 4,4	46,4 \pm 2,1	14,7 \pm 0,4	-	-	5,4 \pm 2,2
Óxido químico H₂SO₄/H₂O₂	34,2 \pm 2,6	47,0 \pm 1,6	7,4 \pm 0,8	7,8 \pm 1,7	-	2,7 \pm 0,6
Óxido químico injertado con pNaSS	53,8 \pm 1,3	30,3 \pm 1,9	5,0 \pm 1,4	5,8 \pm 0,9	3,8 \pm 0,8	1,2 \pm 0,4

La composición global de la superficie del óxido químico es casi la misma que aquella del óxido nativo de la muestra de control, con la excepción de que el porcentaje atómico del titanio es más bajo: asimismo, los porcentajes de carbono y de oxígeno son respectivamente del 33% y el 46% para el óxido nativo y del 34% y el 47% para el óxido químico. Por el contrario, el porcentaje atómico del titanio cae del 15% al 7% después de la oxidación química. De hecho, la cantidad de titanio detectada disminuye en "proporción relativa" a causa de la presencia importante de contaminación con azufre. Este azufre detectado en gran cantidad (8% atómico) en las muestras oxidadas, es probablemente un residuo del baño de oxidación que contiene ácido sulfúrico que persiste a pesar de todos los enjuagues efectuados.

El análisis de la evolución de la composición atómica entre el estado oxidado y el estado injertado con poliNaSS permite de formular los siguientes hechos constatados:

- El porcentaje atómico de carbono aumenta en un factor de 1,6, y pasa del 34% para el óxido químico al 54% para el óxido injertado.

- Paralelamente, el porcentaje de oxígeno disminuye en un factor de 1,6, y su contribución pasa del 47% al 30%. En consecuencia, la razón C/O pasa de 0,7 para el óxido solo a 1,8 para el óxido injertado con poliNaSS. Esto parece lógico, dado que las moléculas de NaSS añadidas contienen poco oxígeno respecto a carbono.

- La contribución del titanio disminuye también del 7,4% al 5%, porque el óxido queda enmascarado y el titanio se detecta más difícilmente bajo el espesor del polímero injertado.

- Aparición de sodio (4%), y mantenimiento del porcentaje de azufre al 6%, respecto al óxido solo (8%).

Estos resultados confirman que hay polimerización del NaSS y que el poliNaSS está bastante presente en la superficie del titanio.

De otra manera, la razón de los porcentajes atómicos Na/S oscila entre 0,6 y 0,7, por lo que lógicamente debe ser 1. Esto puede explicarse por el hecho que el estireno sulfonato de sodio NaSS es una sal que se disocia en medio acuoso y, por lo tanto, es posible que el sodio se compleje a otro contraión.

En las figuras 3A-3E se dan las desconvoluciones de las diferentes contribuciones de los elementos C1s, O1s, Ti2p y S2p de las muestras oxidadas químicamente e injertadas con poliNaSS.

El aspecto de la desconvolución del espectro C1s del carbono (a la izquierda) del óxido injertado (figura 3B) se parece sensiblemente a aquel del óxido no injertado (figura 3A). Sin embargo, el porcentaje más importante de especies hidrocarbonadas a 284,6 eV se atribuye a la cadena carbonada y a los ciclos del poliNaSS injertado (enlaces CHx y C=C). Esta contribución representa actualmente casi la totalidad (85%) del carbono presente.

El resto se reparte entre los componentes unidos al oxígeno, a intensidades mucho más bajas que las anteriores (15% del carbono presente frente a un 35% para el óxido solo).

En el espectro O1s del oxígeno (a la derecha), la contribución habitual del hidroxilo a 532 eV está desplazada hacia las bajas energías a 531,5 eV. Esto puede atribuirse a los iones SO_3^- de los grupos funcionales sobre los ciclos del poliNaSS; este componente (50% del oxígeno presente) reagrupa también los carbonilos C=O y potencialmente una parte de los hidroxilos OH, si es que están presentes.

La desconvolución del espectro de Ti2p (a la izquierda) del óxido injertado (figura 3D) tiene el mismo aspecto que el óxido no injertado (figura 3C), con un componente Ti(IV) único e incluso menos intenso, porque el titanio presente en el óxido TiO_2 se aleja de la zona analizada, enmascarado por la capa de polímero.

La posición del pico del azufre a 168,1 eV (con la correspondencia respecto a O1s a 531,5 eV) muestra que el azufre está presente en forma de iones sulfonato SO_3^- . El pico S2p_{1/2} está situado con un Δ de energía de 1,18 eV, hacia 169,3 eV.

La figura 3E hace referencia a la comparación de los espectros S2p_{3/2} del azufre, obtenidos respectivamente sobre el óxido químico solo (a la izquierda) y el óxido químico injertado (a la derecha). Se observa fácilmente el cambio de la posición del pico S2p_{3/2} de 168,9 eV a 168,1 eV entre los estados oxidado e injertado. Estos demuestran que el azufre de la muestra injertado con poliNaSS está presente en forma de iones sulfonato SO_3^- , y también sulfato SO_4^{2-} , lo que confirma de nuevo el injerto del poliNaSS.

El pico del Na1s del sodio surge a una energía de 1072 eV.

d) Energía superficial para medir el ángulo de contacto

Se pone una gota de líquido sobre una superficie, y después de la obtención de la posición de equilibrio, se determina el ángulo entre la tangente de la gota y la superficie con ayuda de un goniómetro.

Las mediciones del ángulo de contacto se realizan por el "método de la gota posada", en modo estático, con ayuda

de un aparato DSA 10 (Krus). La energía superficial se dedujo de las mediciones de estos ángulos por el método de Owens-Wendt.

$$\frac{\gamma_L(\cos\theta+1)}{2\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_S^p} * \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_S^d}$$

$$\frac{\gamma_L(\cos\theta+1)}{2\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_S^p} * \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_S^d}$$

5 Se depositan gotas de 0,5 µl de diferentes disolventes sobre las superficies: agua destilada, formamida (al 99,5%, Aldrich), etilenglicol y diyodometano. Las mediciones se toman una vez alcanzado el estado de equilibrio después de depositar cada gota, más o menos aproximadamente 5 segundos. Se fotografían al menos seis zonas de la superficie sobre dos muestras diferentes elaboradas de acuerdo con el mismo protocolo para verificar así la homogeneidad de las superficies estudiadas. El error experimental se estima en ± 2°. Los resultados de las mediciones se representan en el tabla 4.

10 Tabla 4: Ángulos de contacto medidos sobre las superficies de titanio oxidadas químicamente e injertadas con poliNaSS directamente

Ángulos de contacto	Agua	Formamida	Etilenglicol	Diyodometano
Control de titanio	59 ± 5	35 ± 5	38 ± 5	48 ± 5
Óxido químico	31 ± 7	18 ± 4	20 ± 6	30 ± 6
Óxido químico + pNaSS	16 ± 5	18 ± 5	17 ± 4	40 ± 5

Se constata una disminución del valor del ángulo de contacto con el agua al pasar de la muestra de control de titanio al titanio injertado con poli NaSS debido al carácter hidrófilo del poli NaSS.

15 A partir de los valores de los ángulos de contacto, se calculan las energías superficiales correspondientes por el método de Owens-Wendt (Tabla 5).

Tabla 5

Energía superficial	Energía superficial global γ (mN/m)	Componente dispersivo γ ^d (mN/m)	Componente polar γ ^p (mN/m)
Control de titanio	44,3 (±2,3)	27,7 (±1,1)	16,5 (±1,2)
Óxido químico	59,2 (±2,3)	26,1 (±1,0)	33,1 (±1,3)
Óxido químico + pNaSS	64,9 (±1,9)	16,9 (±0,7)	47,9 (±1,2)

20 Se constata que el valor global de la energía superficial aumenta cada vez más al pasar del titanio pulido al titanio injertado con poliNaSS. Así pues, se pasa de 44,3 mN/m para el titanio no modificado a 59,2 mN/m para el titanio oxidado, y a 64,9 mN/m para el titanio injertado. Este aumento se debe principalmente al aumento del componente polar de la energía cuya contribución se multiplica por 2 entre los estados no modificado y oxidado; esta misma contribución aumenta prácticamente en un factor de 3 entre los estados no modificado e injertado, mientras que aquella del componente dispersivo disminuye en el mismo tiempo en un factor 1,6.

25 La oxidación química con peróxido de hidrógeno provoca en efecto un aumento de la aparición de grupos TiOH así como el carácter hidrófilo de la superficie del titanio.

Posteriormente, el injerto del poliNaSS aumenta ligeramente la energía superficial por comparación con el titanio oxidado químicamente. La energía superficial pasa de 59,2 a 64,9 mN/m, siendo el NaSS una molécula polar gracias a su grupo sulfonato iónico, y portador de tres átomos de oxígeno.

30

Experiencia anexa:

5 El injerto de polimetacrilato de metilo (PMMA) se realizó de una manera similar a la del poli NaSS. La medición del ángulo de contacto de una gota de agua sobre del titanio injertado con PMMA dio un valor de 65°, cercano al valor de 70° obtenido sobre el PMMA puro. Esta experiencia confirma que es posible injertar diferentes polímeros en la superficie del titanio.

Ejemplo 2: Mejora de la densidad de injerto con poliNaSS

Para optimizar la cantidad de polímero injertado sobre el titanio, se han modificado diferentes parámetros en el proceso del ejemplo 1 anterior. Así pues, se obtuvo una densidad más elevada que 15,4 µg/cm², tal como la medida por dosificación con azul de toluidina, con los siguientes parámetros (proceso A):

- 10
- oxidación por utilización de una mezcla secuencial: H₂SO₄ durante 1 minuto y después H₂O₂ durante 2 minutos;
 - utilización de sulfato de hierro como catalizador en la mezcla H₂SO₄/ H₂O₂; y
 - reacción de polimerización a 70°C durante 15 horas.

15 Con un proceso de este tipo, la densidad de injerto obtenida es particularmente elevada respecto a las densidades que pueden obtenerse con el proceso indirecto por silanización de la técnica anterior. Además, el injerto obtenido con el proceso A es estable hasta después de 1 mes, no observándose ninguna parte de polímero en la superficie del titanio (Tabla 6)

Tabla 6: estabilidad del injerto por el proceso A

	Densidad de injerto (µg/cm ²) 1 día	Densidad de injerto (µg/cm ²) 2 días	Densidad de injerto (µg/cm ²) 1 mes
Proceso A	15,4 ± 3,8	15,5 ± 3,5	15,5 ± 3,4

20 **Ejemplo 3: Actividad celular tras contacto con las superficies modificadas**

A) Desarrollo de osteoblastos en la superficie de titanio modificada

Las células elegidas para estudiar la actividad celular tras contacto con las superficies de titanio modificadas pertenecen a una línea derivada de osteoblastos humanos MG-63. Se han realizado mediciones de adherencia, de la actividad fosfatasa alcalina y de las cantidades de fosfato de calcio precipitado.

25 Las mediciones de adherencia de las células MG63 se realizan después de 30 minutos de incubación bajo una fuerza constante de 140 dinas/cm². Se constata que el porcentaje de células separadas disminuye del titanio oxidado (14%) al titanio injertado con poliNaSS (8%). Las superficies injertadas con poliNaSS mejoran tanto la adherencia como su carácter hidrófilo a un nivel suficientemente cercano al de las superficies únicamente oxidadas.

30 Las mediciones de adherencia realizadas 4 horas después de la incubación muestran resultados similares aunque las diferencias son menos marcadas.

La diferenciación celular se ha estudiado igualmente a través de dos marcadores principales: la actividad fosfatasa alcalina y la mineralización.

35 La primera etapa fue medir la actividad de la fosfatasa alcalina de las células para el papel primordial de esta enzima en la formación del hueso y su efecto inductor sobre el depósito mineral porque regula el transporte de fosfato. La presencia de poli NaSS injertado en la superficie del titanio aumenta de manera significativa la actividad fosfatasa alcalina del orden de un 25% por comparación con la superficie de titanio oxidado.

40 La segunda etapa de la diferenciación se caracteriza por la formación de hueso y de depósito mineral: la calcificación. Por lo tanto, la dosificación de fosfato de calcio se realiza para determinar el estado de diferenciación alcanzado por los osteoblastos MG-63. Se constató que las cantidades de calcio extraídas de las células aumentan de manera significativa (aproximadamente un 30%) cuando los soportes se injertan con poliNaSS respecto a las superficies oxidadas.

45 Los últimos resultados obtenidos se refieren al implante de prótesis de titanio modificado con poliNaSS, poli ácido metacrílico o la mezcla de los dos polímeros. Estos ensayos preliminares se han realizado con muestras de titanio que no se han caracterizado de una manera tan detallada como las muestras injertadas con poliNaSS durante el estudio de la adherencia de osteoblastos humanos MG-63. El objetivo del estudio era evaluar *in vivo* la respuesta tisular del titanio injertado con grupos sulfonato o carboxilato. Para alcanzar este objetivo, se implantaron cilindros de

titanio modificado o no modificado al nivel del cóndilo femoral de conejos que se sacrificaron al final de 4 semanas. Se evalúa una cuantificación de la superficie ósea recién formada alrededor de los implantes a partir de un corte de cada muestra gracias a un analizador de imágenes (figura 4).

5 De una manera semi-cuantitativa, se puede observar que sobre la muestra revestida de poli NaSS, el hueso se distribuye regularmente a lo largo de la superficie ósea con las superficies de contacto relativamente extendidas. No se observa tejido fibroso ni nódulos cartilaginosos, al contrario que con los implantes de titanio no modificado.

Para la composición que contiene únicamente grupos carboxilato, están presentes los contactos entre el hueso y el implante pero las superficies son más pequeñas y menos numerosas. Existen zonas de tejido fibroso en contacto con la superficie implantada que contienen células gigantes.

10 La presencia del grupo sulfonato aumenta la cantidad de tejido óseo en contacto con el implante. A la inversa, la presencia de grupos carboxilato favorece la formación de tejido fibroso.

15 Se realizó una evaluación más cuantitativa del contacto hueso/implante por histomorfometría. El porcentaje promedio de contacto hueso/implante para el titanio no modificado es del 32% y del 38% para el titanio modificado con el sulfonato. El porcentaje de contacto disminuye fuertemente para el implante revestido con grupo carboxilato (12%). El porcentaje de contacto cartilago/implante varía del 1,3% para el titanio SO_3^- al 8% para titanio carboxilado. El punto importante es que el porcentaje de contacto hueso + cartilago para el titanio sulfonatado es superior al medido para el titanio no modificado.

B) Inhibición de la adherencia bacteriana

20 Respecto a la adherencia bacteriana se han realizado algunas mediciones con *Staphylococcus aureus*. Se han medido tasas de inhibición de adherencia bacteriana del 79% respecto al titanio pulido y del 54% respecto al titanio oxidado. Estos primeros resultados confirman muy alentadoramente aquellos obtenidos durante la medición de la adherencia de *Staphylococcus aureus* y de *Streptococcus pyogenes* sobre el poliNaSS. Se han confirmado recientemente sobre implantes de silicona revestida de grupos sulfonato que permiten disminuir *in vivo* la adherencia bacteriana en 2 unidades logarítmicas.

25

REIVINDICACIONES

1. Proceso de injerto de polímeros bioactivos sobre un material protésico de titanio o de aleación de titanio que comprende las siguientes etapas:
 - 5 - la generación de especies activas donadoras de radicales libres en la superficie del material protésico de titanio o de aleación de titanio por oxidación de dicho material protésico de titanio o de aleación de titanio;
 - la generación de radicales libres en la superficie del material protésico de titanio o de aleación de titanio por reacción térmica a una temperatura comprendida entre 40 y 100°C; y
 - 10 - la colocación de dicho material protésico de titanio o de aleación de titanio sobre el que se generan los radicales libres en presencia de al menos un monómero portador de una función que permite una polimerización radicalaria, permitiendo la polimerización radicalaria de dicho monómero la formación de un polímero bioactivo, realizándose dicha polimerización radicalaria en ausencia de oxígeno.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el que las especies activas donadoras de radicales libres se generan en la superficie del material protésico por oxidación con una mezcla ácido/H₂O₂.
3. Proceso según la reivindicación 2, en el que el material protésico es una aleación de titanio, en particular una aleación basada en níquel, vanadio, aluminio, zirconio y/o molibdeno.
4. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los radicales libres se obtienen por reacción térmica a una temperatura de 70°C.
5. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los radicales libres se obtienen antes de, preferiblemente durante, o después de la etapa de puesta en contacto de los monómeros con dicho material.
- 20 6. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el monómero presenta al menos un doble o triple enlace, en particular en el que el monómero lleva un grupo vinílico.
7. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, al menos un monómero lleva una función carboxilo o sulfonato.
8. Proceso según la reivindicación 6, en el que el monómero es ácido acrílico, ácido metacrilato, metacrilato de metilo (MMA), acrilamida de N-(sulfonato de fenil sodio) (NaAS), metacrilamida de N-(sulfonato de fenil sodio) (NaMS), estireno sulfonato de sodio (NaSS), metacrilato fosfato de etilenglicol, metacrilato di-, isopropilideno, monómeros portadores de grupos osídicos tales como glucosa, glucofuranosa, sacarosa, poliosa, fructosa o cualquier mezcla de estos compuestos.
9. Proceso según la reivindicación 8, siendo el monómero estireno sulfonato de sodio (NaSS).
- 30 10. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha reacción radicalaria se realiza en ausencia de oxígeno, durante al menos aproximadamente 30 minutos, preferiblemente durante entre 1 y 48 horas, preferiblemente durante aproximadamente 15 horas.
11. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el injerto de poliNaSS sobre titanio, que comprende:
 - 35 - la oxidación del titanio para generar en la superficie de dicho titanio especies activas donadoras de radicales libres;
 - la colocación del titanio sobre el que se generan las especies activas en presencia de NaSS a una temperatura comprendida entre 40 y 100°C, durante al menos 8 horas, en ausencia de oxígeno.
12. Proceso según la reivindicación 11, que comprende:
 - 40 - la oxidación del titanio para generar en la superficie de dicho titanio especies activas donadoras de radicales libres;
 - la colocación del titanio sobre el que se generan las especies activas en presencia de NaSS a una temperatura de 70°C, durante 15 horas, en ausencia de oxígeno.
- 45 13. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material protésico se pule antes de la formación de las especies activas en su superficie, en particular con papel abrasivo, preferiblemente con diferentes papeles abrasivos de granulometría decreciente hasta P1200, en particular papeles abrasivos sucesivos de granulometría P800, P1000 y P1200.
14. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla ácido/H₂O₂ es una mezcla secuencial que comprende la puesta en contacto del material protésico con una disolución de ácido y después la

puesta en contacto con H_2O_2 .

15. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido es ácido fluorhídrico, ácido clorhídrico o H_2SO_4 , preferiblemente H_2SO_4 .

5 16. Proceso según la reivindicación 15, en el que el material protésico es titanio o una de sus aleaciones que se pone en contacto con una disolución ácida de H_2SO_4 durante 1 minuto y después en contacto con una disolución de H_2O_2 durante 2 minutos, siendo la razón H_2SO_4/H_2O_2 preferiblemente de 50/50 (v/v).

17. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 16, en el que las sales metálicas, en particular las sales metálicas elegida de sales de hierro, de níquel, de cromo y de cobre, se añaden a la mezcla ácido/ H_2O_2 , añadiéndose las sales metálicas más particularmente a una concentración que varía de 10^{-4} mol/l a 2 mol/l.

10 18. Proceso según la reivindicación 17, en el que la sal metálica es sulfato de hierro.

19. Material protésico de titanio o de aleación de titanio sobre el que se injerta un polímero bioactivo que puede obtenerse siguiendo el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

15 20. Utilización de un material protésico de titanio o de aleación de titanio según la reivindicación 19, para la fabricación de un implante protésico, en particular para la fabricación de una prótesis articular o de una prótesis dental.

21. Implante protésico caracterizado por que se fabrica a partir de un material protésico de titanio o de aleación de titanio según la reivindicación 19.

20

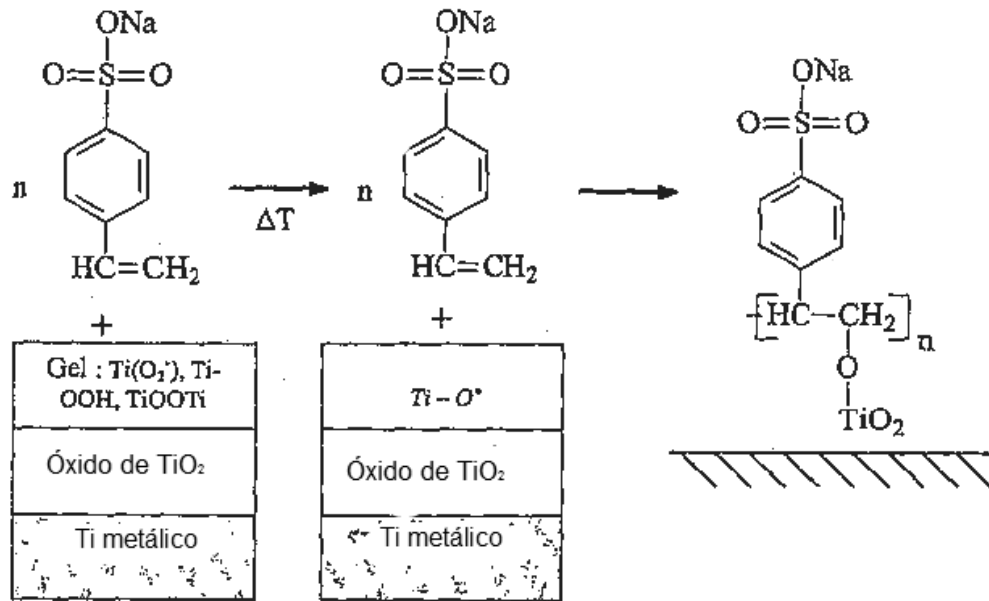


Figura 1

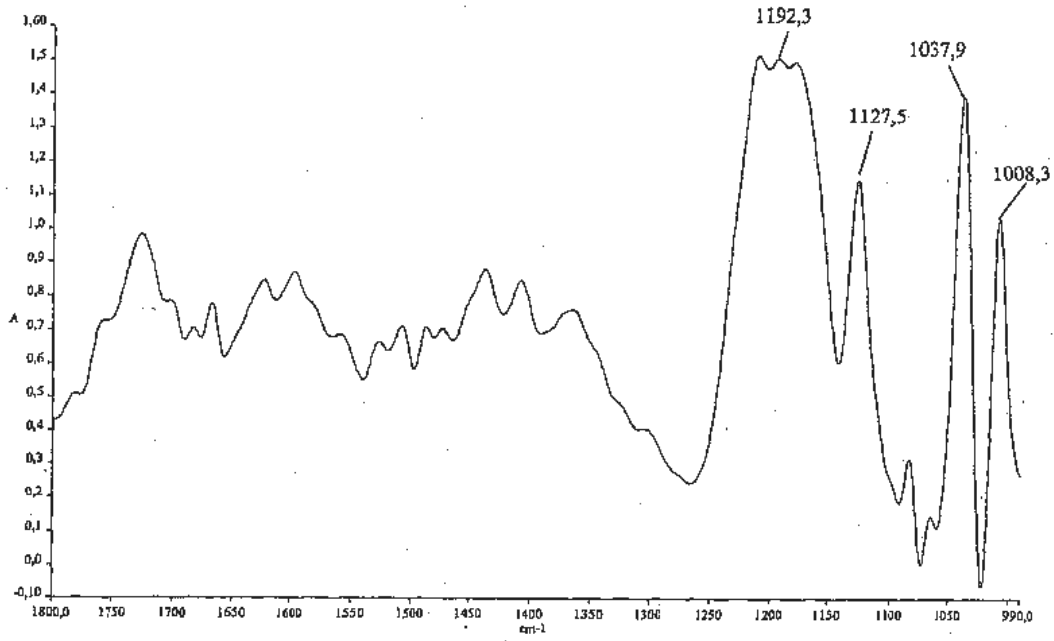


Figura 2

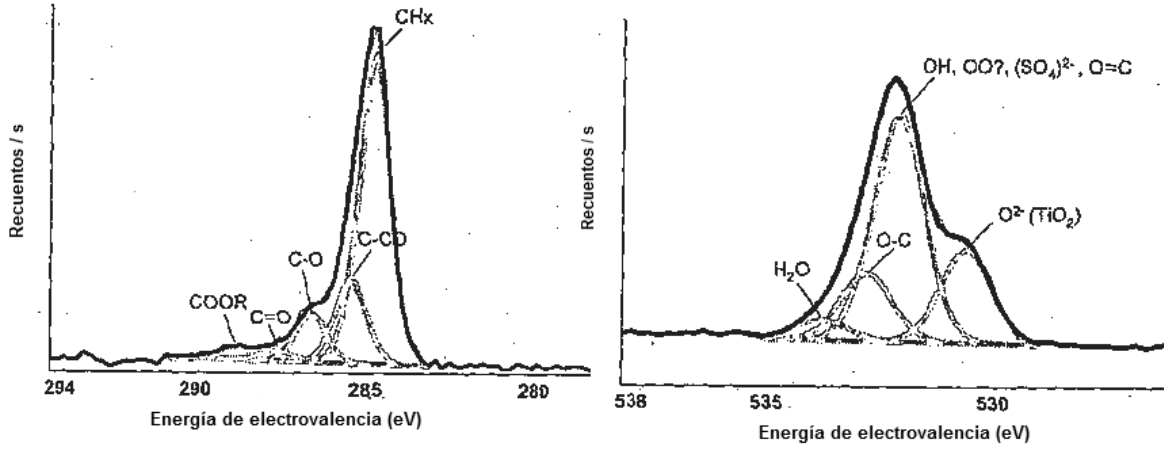


Figura 3A

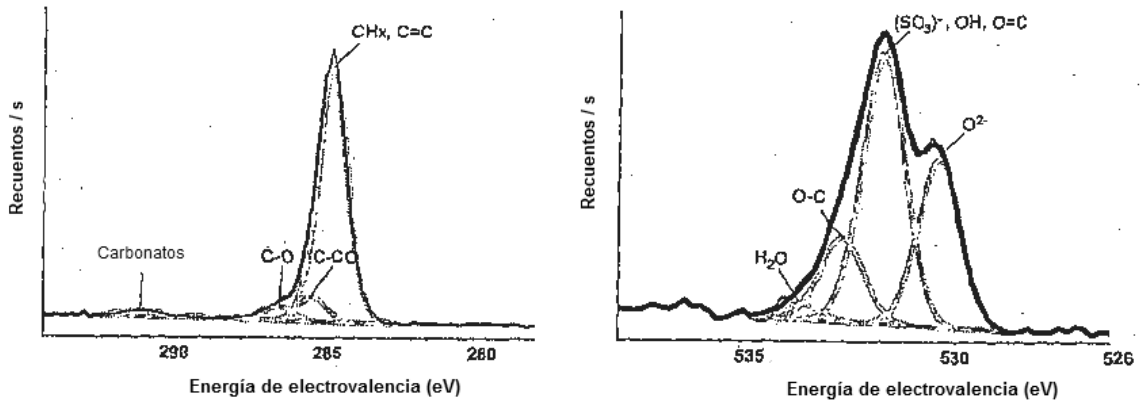


Figura 3B

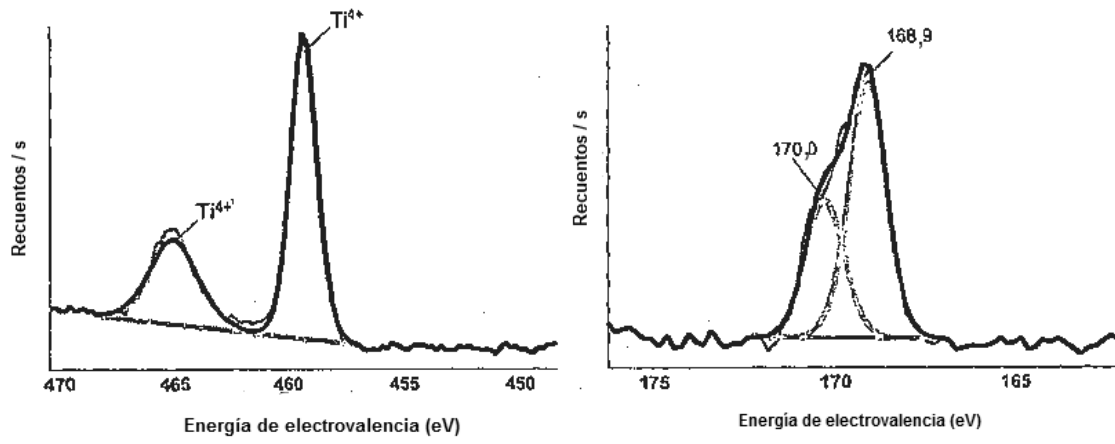


Figura 3C

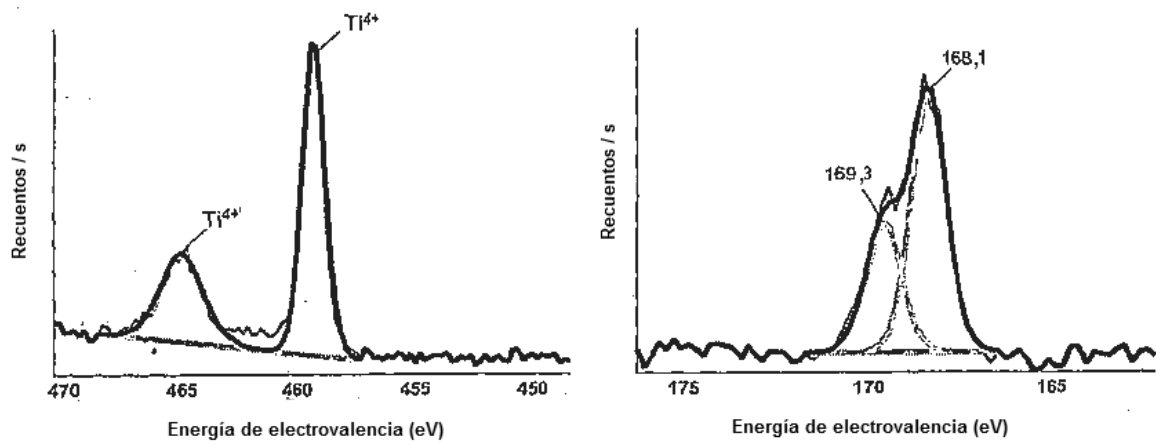


Figura 3D

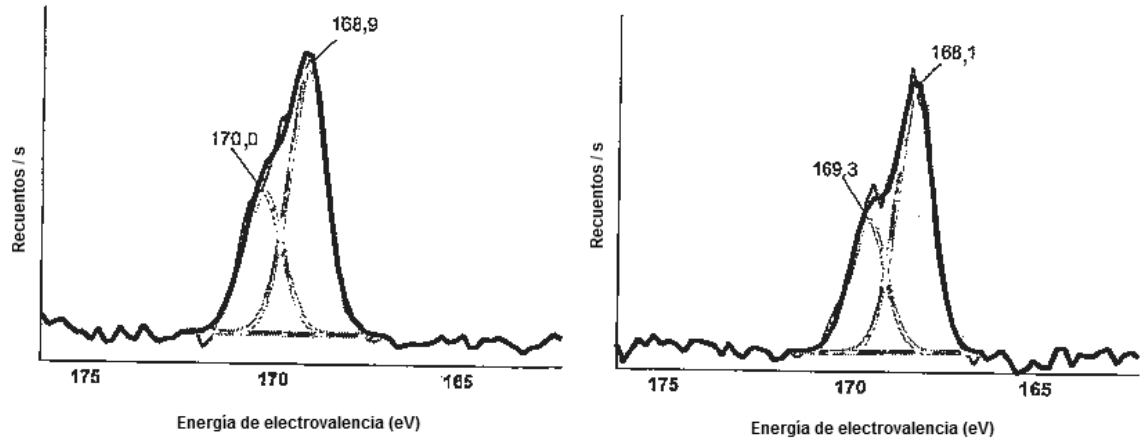


Figura 3E

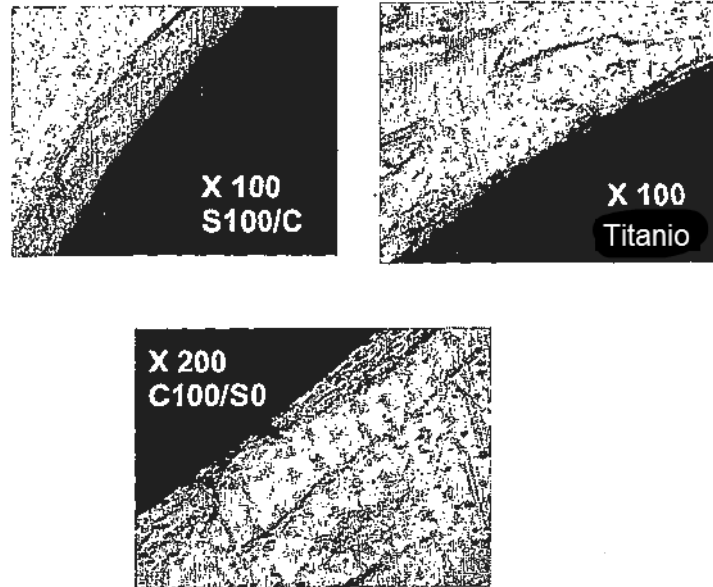


Figura 4