

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 544**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2008 E 08732362 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2164425**

54 Título: **Implantes médicos revestidos en la superficie de nanoestructura y métodos de empleo de los mismos**

30 Prioridad:

**16.03.2007 US 895306 P**  
**12.04.2007 US 911424 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.02.2016**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)**  
**OFFICE OF THE PRESIDENT, 1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR**  
**OAKLAND, CALIFORNIA 94607-5200, US y**  
**THE PENNSYLVANIA STATE RESEARCH FOUNDATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DESAI, TEJAL, A.;**  
**POPAT, KETUL, C. y**  
**GRIMES, CRAIG, A.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 558 544 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

Implantes médicos revestidos en la superficie de nanoestructura y métodos de empleo de los mismos

### Antecedentes de la invención

- 5 El reemplazo total de las articulaciones es un tratamiento eficaz para aliviar el dolor y restaurar la función de pacientes con articulaciones dañadas o degenerativas. Aproximadamente 500.000 operaciones de reemplazo  
 10 totales de caderas y rodillas se llevan a cabo cada año en los Estados Unidos. Aun cuando muchos de los resultados tienen éxito, todavía existen problemas importantes con el desprendimiento y el fallo de los implantes. En efecto, el 25% de las cirugías de reemplazos de caderas tuvieron revisiones debidas a fallos previos de los implantes. La cirugía para reemplazar estos fallos es más difícil y costosa para realizar y tiene un resultado peor que  
 15 la cirugía de reemplazo de la articulación. Si la fijación no es suficiente puede tener lugar desprendimiento y osteólisis del implante. Para superar este problema se opina que los materiales de implante óseos necesitan estimular una regeneración rápida de los huesos con objeto de llenarse en el hueso deficiente y fijar firmemente el implante con el hueso adyacente. La superficie del material debe ser capaz de restablecer las células que forman el hueso, tale como los osteoblastos, de modo que puedan colonizar y sintetizar el nuevo tejido óseo.
- 20 Con objeto de diseñar mejores materiales de implante es importante entender los acontecimientos existentes en la interfase del material óseo. Como se ha citado previamente uno de los importantes enfrentamientos es inducir crecimiento óseo sobre la superficie del implante. El nivel de crecimiento del hueso depende de las características superficiales del implante. El primer acontecimiento que tiene lugar después de la implantación de un biomaterial es la adsorción de proteínas procedentes de la sangre y otros fluidos de los tejidos. Principalmente, un hematoma,  
 25 hinchazón rellena con sangre debida a una rotura del vaso sanguíneo, está presente entre el implante y el hueso. Las citoquinas y los factores de crecimiento estimulan la adquisición de células mesenquimales que se diferencian en osteoblasto que son responsables de la formación ósea. A lo largo del tiempo, el hueso tejido madura dando hueso laminar que endurece más tarde la interfase de implante-óseo. Así pues, las propiedades de la interfase desempeñan un papel crítico en la estabilidad y funcionalidad a largo plazo del implante.
- 30 En un intento de intensificar la estabilidad de implantes endoseosos, han sido empleados gran número de materiales de implante y diseño. Además de materiales prostéticos a base de cementos, ha vuelto mucha atención en los últimos años a implantes microentrelazados que poseen superficies microporosas que permiten el crecimiento del hueso. El trabajo primitivo que utiliza materiales cerámicos oxidados ha puesto de manifiesto que era necesario un diámetro de poro interconectado, mínimo, de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  para un crecimiento óseo  
 35 adecuado (Hulbert et al., J. Biomed Mater Res 1972;6(5):347-74). Se opinó que tamaños de poro más pequeños permitían una mineralización incompleta del tejido que se infiltraba. El empleo subsiguiente de implantes metálicos mostró crecimiento del hueso con tamaños de poro entre 50 y 500  $\mu\text{m}$  (Bobyn et al., Clin Orthop Relat. Res 1980(150):265-70). Sin embargo, estudios recientes han revelado la posibilidad de que muchos poros más pequeños pueden permitir crecimiento hacia dentro del hueso cuando se presentaban en alta densidad dentro de  
 40 sustratos de óxidos metálicos. Por ejemplo, revestimientos de Ca-P nanoporosos en implantes han puesto de manifiesto aposición de crecimiento óseo humano dentro de 2-3 semanas después de la cirugía (Lue et al., J Biomed Mater Res 2001;55(3):360-7). Los osteoblastos cultivados sobre materiales cerámicos de texturas diferentes a escala de nm, ponen de manifiesto también morfologías y velocidades de crecimiento alteradas (Boyan et al., Biomaterials 1996, 17(2):137-46; Popat et al., J Orthop Res 2006, 24(4):619-27; Popat et al., Biomaterials 2005, 26(22):4516-22; Swan et al., Biomaterials 2005, 26(14): 1069-76; Swan et al., J Biomed Mater Res A 2005,72(3):299-95; Webster et al., Biomaterials 2004, 25(19):4731-9; Webster et al., J Biomed Mater Res A 2003, 67(3):975-80; Webster et al., Biomaterials 2000, 21(17):1803-10). No obstante, existen diversos problemas relacionados con la disolución de revestimientos de nanoescalas a lo largo del tiempo, y el quebrantamiento y la separación del sustrato metálico (Bauer et al., Clin Orthop Relat Res 1994, (298):11-8; y Bloebaum et al., Clin Orthop  
 45 Relat Res 1994, (298):19-26). Estos estudios apuntan a la importancia de desarrollo de arquitecturas de nanoescalas más robustas y flexibles para incrementar la yuxtaposición de hueso desde las superficies óseas existentes y estimular nueva formación ósea.

Esta invención describe más adelante direcciones para estas necesidades así como para otras.

### Compendio de la invención

- 50 La presente invención proporciona un implante médico, que comprende una superficie o película que comprende una pluralidad de nanotubos que tienen diámetros de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 300 nm y en una densidad mayor que 10.000.000 de nanotubos por centímetro cuadrado, donde dichos nanotubos comprenden un agente bioactivo para elución al tejido circundante por colocación en un sujeto, y en donde dicha pluralidad de nanotubos comprende, además, una película de cierre que puede erosionarse proporcionando una elución  
 55 retardada del agente bioactivo. En algunas realizaciones, el implante médico es un implante ortopédico, un implante dental, un implante cardiovascular, un implante neurológico, un implante neurovascular, un implante gastrointestinal, un implante muscular o un implante ocular. En algunas realizaciones, el implante médico es un parche para la distribución localizada de dicho agente bioactivo a un tejido blando. En algunas realizaciones, la superficie o película se expande o despliega en la presencia de un líquido hidratante. En algunas realizaciones, la superficie o película

incluye además células, tales como una célula de tronco, una célula progenitora retinal, una células progenitora cardiaca, una célula osteoprogenitora, o una célula progenitora neuronal.

5 En algunas realizaciones la superficie o película está comprendida por poli(DL-lactida-co-glicolida)(PLGA), poli(DL-lactida-co-ε-caprolactona)(DLPLCL), poli(ε-caprolactona)(PCL), cológeno, gelatina, agarosa, poli(metacrilato de metilo), galatín/ε-caorolactona, colágeno-GAG, colágeno, fibrina, PLA, PGA, copolímeros de PLA-PGA, poli(anhídridos),poli(hidroxi ácidos),poli(orto ésteres),poli(fumeratos de propilo),poli(caprolactonas),poli(hidroxivalerato, poliamidas, poliaminoácidos, poliacetales, policianoacrilatos biodegradables, poliuretanos y polisacáridos biodegradables, polipirrol, polianilinas, politiofeno, poliestireno, poliésteres, poliuretanos no biodegradables, poliureas, poli(acetato de vinilo etileno), polipropileno, polimetacrilato, polietileno, policarbonatos, poli(óxido de etileno), copolímeros de los anteriores, mezclas de los anteriores, y aductos de los anteriores, o combinaciones de los mismos..

10 En algunas realizaciones, la superficie o película está compuesta de silicio, titania, circonia, cromo-cobalto, alúmina, sílice, aluminato de bario, titanato de bario, óxido de hierro y óxido de zinc, nitinol, elastinita, tántalo, Elgiloy, finox, Ti6A14V, CoCr, TiC, TiN, L.605, 316, MP35N, MP20N, aleación de acero inoxidable, aleación de acero inoxidable 316L, aleación de acero inoxidable 304, o sus combinaciones.

15 En algunas realizaciones, la superficie o película incluye, además, un agente bioactivo enlazado covalentemente. En algunas realizaciones, los nanotubos incluyen, además, un agente para facilitar la adhesión celular y el crecimiento celular, seleccionado del grupo que consiste en laminina, fibrina, fibronectina, proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, agentes quimiotácticos, y factores de crecimiento. En algunas realizaciones, el agente bioactivo se selecciona de un polipéptido, un factor de crecimiento, un agente esteroide, una terapia con un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo, un DNA, un RNA y siRNA, un agente antimicrobiano, un antibiótico, un fármaco antimicrobiano, un compuesto antiinflamatorio, un agente antitumoral, un agente antiangiogénico, y un agente quinioterápico..

20 En algunas realizaciones, los nanotubos varían en longitud de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 500 μm, tal como de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 70 μm. En algunas realizaciones, los nanotubos tienen un diámetro de poro que varía de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 250 nm. En algunas realizaciones, la superficie o película comprende nanotubos en una densidad mayor que 25.000.000 de nanotubos por centímetro cuadrado, en donde dicha densidad proporciona un adhesivo tisular compatible con una matriz extracelular.

25 En algunas realizaciones, dicha superficie o película varía en espesor desde aproximadamente 1 μm a aproximadamente 2,5 mm, tal como de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 750 μm, que incluye de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 200 μm, y de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 150 μm.

Estos y otros objetos, y ventajas y características de la invención llegarán a ser evidentes a las personas expertas en la técnica al leer los detalles de la invención que se describen más completamente más adelante.

### Descripción detallada de los dibujos

35 La invención se comprende mejor partiendo de la siguiente descripción detallada cuando se lee en conjunción con los dibujos que se acompañan. Se hace hincapié en que, según la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características están expandidas o reducidas arbitrariamente para claridad. En los dibujos están incluidas las siguientes figuras,

40 FIG. 1: es una serie de imágenes SEM (imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido) de superficies nanotubulares de titania. La parte izquierda expone una vista en corte transversal de una muestra fracturada mecánicamente, la parte central es una vista en alzado de superficie nanotubular, y la parte de la derecha es una ampliación alta de la vista de la parte superior de la superficie nanotubular. Los nanotubos tienen aproximadamente 80 nm de diámetro y 400 nm de longitud..

45 FIG. 2: la parte a muestra la adhesión de células estromales medulares y la proliferación sobre poliestireno, titanio y superficies nanotubulares de hasta 7 días de cultivo, superficies nanotubulares que exponen aproximadamente 40% de más proliferación de células al cabo de 7 días de cultivo comparada con superficie de titanio (p<0,05); la parte b expone la viabilidad celular medida como absorbancia utilizando un análisis MTT al cabo de 4 días de cultivo celular sobre poliestireno, titanio y superficie nanotubular.

50 FIG. 3: expone imágenes de microscopía de fluorescencia (10X) de células estromales medulares vivas con calceína sobre (parte a) titanio y (parte b) superficies nanotubulares; las células parecen formar agrupaciones en la superficie nanotubular que está ausente en las superficies de titanio.

55 FIG. 4: expone una serie de imágenes SEM de células estromales medulares de, la médula ósea sobre superficies de titanio y nanotubulares de hasta 7 días de cultivo. Las células muestran morfología esférica sobre titanio (parte a) comparado con la morfología que se extiende en la superficie nanotubular (parte b) después de 1 día de cultivo. Al cabo de 4 días de cultivo todavía muestran morfología esférica sobre superficie de titanio (parte c) comparadas con la morfología en extensión y en grumos en la superficie nanotubular (parte d). Después de 7 días de cultivo, algunas

de las células sobre titanio parecen estar extendidas (parte e), sin embargo las células exponen alto grado de extensión y tienen una comunicación comenzada en la superficie nanotubular (parte f). La imagen SEM con ampliación alta al cabo de 7 días de cultivo (parte g) en superficie nanotubular muestra que extensiones celulares están sobresaliendo en la arquitectura nanotubular.

- 5 FIG. 5: parte a, es una gráfica que expone actividad ALP valorada hasta 3 semanas de cultivo de células estromales medulares sobre titanio y superficie nanotubular después de la proporción de medios completos, resultados normalizados con contenido total de proteínas para tener en cuenta el efecto de diferente número de células sobre cada superficie. La actividad ALP es aproximadamente 50% mayor al cabo de 3 semanas de cultivo en superficies nanotubulares ( $p < 0,05$ ); la parte b es una gráfica que muestra la concentración de Calcio valorada a 3 semanas de cultivo de células estromales medulares en titanio y superficie nanotubular, resultados normalizados con el contenido total de proteínas para tener en cuenta el efecto de número diferente de células sobre cada una de las superficies, el contenido de calcio es aproximadamente 50% mayor al cabo de 3 semanas sobre superficie nanotubular ( $p < 0,05$ ).

- 10 FIG. 6. es una serie de imágenes SEM de MSCs sobre superficies nanotubulares verificado hasta 3 semanas de cultivo. La formación de agrupaciones de células (parte a) y la deposición de material granular (parte b) sobre superficies nanotubulares después de 1 semana. Al cabo de 2 semanas, la superficie está casi totalmente cubierta por células (parte c) y los nanotubos están, además, llenos con matriz (parte d). Después de 3 semanas, la superficie entera está cubierta con células que se extienden bien (parte e) y los nanotubos están casi completamente llenos con constituyentes de la matriz (parte f).

- 15 FIG 7: es una serie de imágenes de análisis histológico de tejido (parte a). tejido sano control-normal, (parte b) que rodea al implante de titanio: (parte c) que circunda un implante nanotubular; los resultados indican que no hay formación de tejido de cicatriz fibroso de ambos implantes el de titanio y el nanotubular, y los tejidos son muy similares con respecto al tejido control, la línea de puntos muestra donde el implante estaba en contacto con tejidos.

FIG. 8: es una gráfica que expone las eficacias de carga de albúmina de suero bovino (BSA) y de lisozima (LYS) en nanotubos.

- 20 FIG. 9, es una serie de gráficas que exponen la fracción de proteína total liberada desde nanotubos llenos con 200 mg (**Parte A**), 400 mg (**Parte B**) y 800 mg (**Parte C**) de BSA y 200 mg (**Parte D**), 400 mg (**Parte E**) y 800 g (**Parte F**) de LYS. El punto de tiempo en el que toda la proteína ha sido liberada está indicado por la línea de puntos. Las concentraciones en estos puntos de tiempo son significativamente diferentes de los puntos de tiempo anteriores, sin embargo no significativamente diferentes de los puntos de tiempo después,  $p < 0,05$ ,  $n = 3$ .

### 30 Descripción detallada de la invención

- La presente invención proporciona un implante médico, que comprende una superficie o película que comprende una pluralidad de nanotubos que tienen diámetros desde aproximadamente 3 nm a aproximadamente 300 nm en una densidad mayor que 10.000.000 de nanotubos por centímetro cuadrado, donde dichos nanotubos comprenden un agente bioactivo de elución al tejido circundante por colocación en un sujeto, y en donde dicha pluralidad de nanotubos comprende, además, una película de cierre que puede erosionarse para proporcionar un elución retardada del agente bioactivo.

- Antes de describir la presente invención, ha de entenderse que esta invención no se limita a realizaciones particulares descritas como podría ser, naturalmente, variar. También ha de entenderse que la terminología empleada en esta memoria es con la finalidad de describir solamente realizaciones particulares, y no está destinada a ser limitante, dado que el alcance de la presente invención será limitado solamente por las reivindicaciones incluidas-

- Donde se proporciona un intervalo de valores, ha de entenderse que cada valor de intervención, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre los límites superior e inferior de tal intervalo, está escrito también específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor establecido o valor de intervención de un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o de intervención en el intervalo establecido se encuentra incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden ser incluidos o excluidos independientemente del intervalo, y que cada intervalo en que cualquiera de los dos, ninguno o ambos límites están incluidos en los intervalos más pequeños está también incluido dentro de la invención, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo establecido. Donde el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, las intervenciones que excluye uno cualquiera o ambos de los límites incluidos están incluidos, asimismo, en la invención.

- A menos que se definen de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos que se emplean en esta memoria tienen el mismo significado como se comprende comúnmente por los expertos en la técnica a que pertenece la invención. Aun cuando cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria pueden emplearse en la práctica o en el ensayo de la presente invención, algunos métodos y materiales potenciales y preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones citadas en esta memoria se incorporan a la misma por referencia a descripción, y describen los métodos y/o materiales en relación con los que

se citan las publicaciones. Ha de entenderse que la presente descripción supera cualquier descripción de una publicación incorporada en la extensión en que haya una contradicción.

Ha de anotarse que según se emplea en esta memoria y en las reivindicaciones incluidas, las formas singulares "a", "uno o una" y "el o la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y las referencias a "el compuesto" incluye referencias a uno o más compuestos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones descritas en la presente memoria se proporcionan solamente para su descripción anterior a la fecha de publicación de la presente solicitud. Nada de esta memoria ha de interpretarse como una admisión a la que no está titulada la presente invención para anteceder tal publicación en virtud de una publicación previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas actuales de publicación que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

### *Introducción*

La presente invención se basa en la observación de que las superficies nanotubulares proporcionan una plantilla favorable para el crecimiento y diferenciación de células óseas y la adhesión, proliferación y viabilidad de células superiores soportada, al tiempo que no causa respuesta inmunitaria adversa en condiciones in vivo. La biocompatibilidad de óxidos metálicos ya ha sido probada a medida que los materiales tienen aplicaciones clínicas actuales en prótesis ortopédicas y en implantes dentales. Los inventores han descubierto que la actividad osteoblástica puede aumentarse significativamente utilizando nanotopografías reguladas. Por tanto, la incorporación de tales nanoarquitecturas en superficies de implantes médicos facilita, además, el cultivo y el mantenimiento de estados de células que se diferencian, y favorece la oseointegración a largo plazo.

Los inventores han descubierto también que estos nanotubos pueden cargarse opcionalmente con medicamentos o agentes biológicos tales como proteínas. Además, la liberación o elución de los medicamentos o agentes biológicos desde los nanotubos puede regularse variando la longitud, el diámetro y el grosor de la pared del tubo. Cambiando el diámetro el grosor de la pared y la longitud de los nanotubos, las características cinéticas de liberación pueden alterarse para medicamentos específicos con objeto de conseguir una liberación prolongada del fármaco a lo largo de un período de tiempo. Por tanto, estas superficies nanotubulares poseen diversas aplicaciones potenciales, específicamente para implantes en que se desea una integración más rápida junto con una liberación controlada de fármacos tales como antibióticos o factores de crecimiento.

La invención se describe ahora con mayor detalle.

### *Métodos y composiciones*

Como se ha indicado anteriormente la presente invención proporciona un implante médico que comprende una superficie o película que comprende una pluralidad de nanotubos que tienen diámetros de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 300 nm y en una densidad mayor que 10.000.000 de nanotubos por centímetro cuadrado, donde dichos nanotubos comprenden un agente bioactivo de elución al tejido circundante por colocación en un sujeto, y en donde dicha pluralidad de nanotubos comprende, además, una película de cierre que puede desgastarse para proporcionar una elución retardada del agente bioactivo. Los implantes médicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un implante ortopédico, un implante dental, un implante cardiovascular, un implante neurológico, un implante neurovascular, un implante gastrointestinal, un implante muscular, un implante ocular, y similares. En algunas realizaciones, la superficie o película es un parche que puede utilizarse para la liberación localizada del agente bioactivo a un tejido blando, tal como hígado, riñón, tracto gastrointestinal, páncreas, próstata, colon, y similares. El agente bioactivo ejemplar incluye, pero no se limita a, polipéptidos, ácidos nucleicos tales como DNA, RNA y siRNA, factores de crecimiento, agentes esteroides, terapias de anticuerpo, agentes antimicrobianos, antibióticos, fármacos antirretrovirales, compuestos antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes antiangiogénicos, y agentes quimioterápicos. En ciertas realizaciones, la superficie o película incluye, además, un agente bioactivo enlazado covalentemente. En algunas realizaciones, la superficie o película incluye, además, células tales como células pluripotenciales, células progenitoras retinales, células progenitoras cardíacas, células osteoprogenitoras, células progenitoras neuronales, y similares.

En algunas realizaciones, la superficie o película se expande o desdobra en presencia de un líquido hidratante, tal como agua presente en un sitio de inserción de un sujeto. Por "expande" se entiende que la superficie o película se hace mayor en tamaño o volumen como resultado que rodea al líquido que hidrata la superficie o película. Por "desdobra" se entiende que la superficie o película se despliega, se desarrolla, o se desenvuelve como resultado de rodeo del líquido que hidrata la superficie o película.

Pueden producirse superficies y películas que sirven de ejemplo a partir de una diversidad de materiales adecuados que proporcionan la capacidad de formar la pluralidad deseada de los nanotubos. Los materiales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, polímeros biodegradables o biodesgastables, tales como poli(DL-lactida-co-glicolida)(PLGA), poli(DL-lactida-co-ε-caprolactona)(DLPLCL), o poli(ε-caprolactona)(PCL), así como polímeros naturales biodegradables, tales como cológeno, gelatina, agarosa, y similares. El PLGA es un copolímero que se

- erosiona en bloques de polilactida (PLA) y poliglicolida (PGA), donde el ingreso de agua es más rápido que la velocidad de degradación. En este caso, la degradación tiene lugar a través del conjunto de la muestra de polímero, y prosigue hasta alcanzar un peso molecular crítico, en cuyo punto los productos de degradación se hacen lo bastante pequeños para ser solubilizados. En este punto, la estructura comienza a llegar a ser significativamente más porosa e hidratada. La combinación de PGA de reabsorción rápida y de PLA de reabsorción lenta permite que los copolímeros de PLGA tengan una velocidad de resorción de aproximadamente 6 semanas. Los polímeros de PLGA de reabsorción rápida tienen alta contracción, que puede no presentar un sustrato estable para células que extienden la matriz extracelular. Además, la producción de especies de degradación ácidas por polímeros que se reabsorben rápidamente puede comprometer la reparación de tejidos..
- Además, la superficie o película puede producirse partiendo de una variedad de óxidos metálicos adecuados seleccionados del grupo que consiste en alúmina, titania, Ti6Al4V, níquel, circonia, cobalto-cromo (CoCr), alúmina, sílice, aluminato de bario, óxido de hierro, y óxido de zinc, así como también aleaciones de memoria confirmada, tales como nitinol, o sus combinaciones. En ciertas realizaciones, los nanotubos de fabrican de titania. Además, otros ejemplos de metales adecuados o de aleaciones de metales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aceros inoxidable (p.ej., 316, 316L ó 304), aleaciones de níquel-titanio que incluyen tipos de memoria configurada o superelástica (p.ej., nitinol o elastinita); inconel; metales nobles que incluyen cobre, plata., oro, platino, paladio e iridio; metales refractarios que incluyen Molibdeno, Wolframio, Tántalo, Titanio, Renio, o Niobio; aceros inoxidable aleados con metales nobles y/o refractarios; magnesio; metales amorfos; metales deformables plásticamente /p.ej. ,tántalo), aleaciones a base de níquel (p. ej., aleaciones que incluyen platino, oro y/o tántalo); aleaciones a base de hierro (p.ej., que incluyen aleaciones con platino, oro y/o tántalo), aleaciones a base de cobalto (p.ej., aleaciones que incluyen platino, oro y/o tántalo): aleaciones de cobalto-cromo (p. ej., Elgiloy); aleaciones de cobalto-cromo-níquel (p. ej. finox); aleaciones de cobalto, níquel, cromo y molibdeno (p.ej., MP35N o MP20N); aleaciones de cobalto-cromo-vanadio; aleaciones de cobalto-cromo-wolframio; aleaciones de platino-iridio; aleaciones de platino-wolframio; aleaciones de magnesio; aleaciones de titanio (p. ej, TiC, TiN); aleaciones de tántalo (p.ej., TaC, TaN); L605; materiales bioabsorbibles, que incluyen magnesio; u otros metales biocompatibles y/o aleaciones de los mismos. Preferiblemente, el marco implantable comprende un material de aleación de níquel titanio (NiTi) que se autoexpande, acero inoxidable o una aleación de cobalto-cromo. La aleación de níquel titanio se vende bajo el nombre comercial Nitinol.
- En algunas realizaciones, al menos un subconjunto de la pluralidad de nanotubos incluyen, además, una película de cierre que se erosiona evitando la elución retardada del agente bioactivo al tejido circundante por colocación del implante en un sujeto. Por ejemplo, la superficie o película puede incluir un primer subconjunto de nanotubos que incluye un agente bioactivo y un segundo subconjunto de nanotubos que incluye un agente bioactivo y cerrado con una película de cierre que se erosiona. En un ejemplo tal, el primer subconjunto de nanotubos carece de la película de cierre que se erosiona y puede eluir el agente bioactivo por colocación en el sujeto, proporcionando con ello una liberación precoz del agente bioactivo. A lo largo del tiempo, a medida que la película de cierre situada sobre el segundo subconjunto de nanotubos se erosiona, el agente bioactivo puede liberarse. Como resultado, la combinación de estructuras cerradas y sin cerrar proporciona dos perfiles de elución, una primera elución precoz que procede del subconjunto sin cerrar y una segunda elución más tardía que procede de la erosión de la película de cierre que procede del segundo subconjunto de cierre.
- En general, los nanotubos se fabrican para tener un diámetro que varía de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 300 nm, que incluye aproximadamente 10 nm a aproximadamente 250 nm, aproximadamente 20 nm a aproximadamente 225 nm, aproximadamente 30 nm a aproximadamente 200 nm, aproximadamente 50 nm a aproximadamente 190 nm, aproximadamente 60 nm a aproximadamente 180 nm, aproximadamente 70 nm a aproximadamente 170 nm, aproximadamente 80 nm a aproximadamente 160 nm, y aproximadamente 90 nm a aproximadamente 150 nm. En algunas realizaciones los nanotubos se fabrican en una densidad mayor que al menos aproximadamente, 10.000.000 de nanotubos por centímetro cuadrado, que incluye al menos aproximadamente 25.000.000 de nanotubos por centímetro cuadrado, y al menos aproximadamente 50.000.000 de nanotubos por centímetro cuadrado
- En general, los nanotubos se fabrican para tener una longitud que varía de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , que incluye aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 450  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 350  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ . aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 8  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 9  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 90  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 18  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 11  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 70  $\mu\text{m}$ . aproximadamente 12  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 60  $\mu\text{m}$ . aproximadamente 13  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 14  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ , y aproximadamente 16  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ . En una realización ejemplar, los nanotubos tienen una longitud de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ .
- En general, los nanotubos se fabrican para tener poros que varían en diámetro de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 250 nm, que incluye 4 nm a aproximadamente 225 nm, que incluye 5 nm a aproximadamente 200 nm, que incluye 6 nm a aproximadamente 175 nm, que incluye 7 nm a aproximadamente 150 nm, que incluye 8 nm

a aproximadamente 125 nm, que incluye 9 nm a aproximadamente 100 nm., que incluye 10 nm a aproximadamente 75 nm, que incluye 11 nm a aproximadamente 70 nm, que incluye 12 nm a aproximadamente 65 nm, que incluye 13 nm a aproximadamente 60 nm, que incluye 14 nm a aproximadamente 50 nm, que incluye 15 nm a aproximadamente 45 nm, aproximadamente 20 nm a aproximadamente 40 nm, aproximadamente 22 nm a

5 aproximadamente 38 nm, aproximadamente 24 nm a aproximadamente 36 nm, aproximadamente 26 nm aproximadamente 34 nm, aproximadamente 28 nm aproximadamente 32 nm, y aproximadamente 29 nm a aproximadamente 31 nm, En una realización ejemplar, los poros tienen un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 40 nm.

En general, la superficie o película se fabrica para tener un grosor que varía de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2,5 mm, que incluye aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2 mm, aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1,5 mm, aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1 mm, aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 750  $\mu\text{m}$ , y aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 600  $\mu\text{m}$ . En ciertas realizaciones, la superficie o película tiene un grosor que varía de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , que incluye aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .

10 aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 80  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 6  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 70  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 60  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 8  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 9  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 40  $\mu\text{m}$ , y aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ . En una realización ejemplar, la superficie o película tiene un grosor de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ .

En ciertas realizaciones, la superficie o película incluye además agentes biológicos y aditivos ventajosos para impartir, por ejemplo, propiedades adicionales osteoinductivas y osteoconductoras a los implantes modificados en la superficie. En realizaciones adicionales, los agentes biológicos y aditivos ventajosos se añaden a los nanotubos para elución al tejido circundante por colocación del implante en el paciente. Esto puede ser particularmente útil para implantes de la presente invención que son implantes óseos. En una realización ejemplar, pueden añadirse al implante uno o más agentes biológicos o aditivos antes de la implantación. Los agentes biológicos y aditivos pueden adsorberse e incorporarse en la superficie o película que comprende los nanotubos sumergiendo el implante en una solución o dispersión que contiene los agentes y/o aditivos, o mediante otros medios reconocidos por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, los nanotubos pueden desprender los agentes biológicos y aditivos adsorbidos de un modo controlado en el tiempo. De este modo, las ventajas terapéuticas comunicadas por la adición de agentes biológicos y aditivos pueden continuarse durante un período de tiempo extendido. Puede ser deseable incluir ciertos aditivos en la solución electrolítica utilizada durante el proceso de anodización electroquímica con objeto de aumentar las propiedades de adsorción de los nanotubos formados sobre el implante modificado en la superficie. Por ejemplo, la inclusión de sales en la solución electrolítica empleada durante el proceso de anodización electroquímica puede dar por resultado la incorporación de sustancias iónicas en los nanotubos formados en la superficie o película. La inclusión de sustancias iónicas en los nanotubos puede comunicar mayores propiedades de adsorción a los nanotubos debido a las interacciones polares existentes entre los nanotubos que contienen sustancias iónicas y los agentes biológicos y aditivos.

20

25

30

35

Los agentes biológicos o aditivos pueden estar en una forma purificada, parcialmente en forma purificada, en forma recombinante, o en cualquier otra forma apropiada para su inclusión en el implante médico modificado en la superficie. Es deseable que los agentes o aditivos estén libres de impurezas y de contaminantes. Los agentes ejemplares para facilitar la adhesión celular y el crecimiento de células incluyen laminina, fibrina, fibronectina, proteoglicanos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, agentes quimiotácticos y factores de crecimiento, y similares.

40

Por ejemplo, pueden incluirse factores de crecimiento en el implante modificado en la superficie o en los nanotubos para elución al tejido circundante por colocación del implante en el paciente para mejorar el crecimiento de hueso o de tejido. Como ejemplos no limitadores de factores de crecimiento que pueden incluirse están el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor b de crecimiento de transformación (TGF-b), el factor I de crecimiento relacionado con insulina (IGF-I), el factor II de crecimiento relacionado con insulina (IGF-II), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), beta-2-microglobulina (BDGF II) y factores morfogenéticos óseos. Los factores morfogenéticos óseos son factores de crecimiento cuya actividad es específica para el tejido óseo e incluyen, pero no se limitan a, proteínas de hueso desmineralizado, matriz ósea desmineralizada (DBM), y en proteína ósea particular (BP) o proteína morfogenética ósea (BMP). Factores osteoinductivos tales como fibronectina (FN), osteonectina (ON), factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF), extractos de fijación de cemento (CAE), quetanserina, hormona de crecimiento humano (HGH), hormonas de crecimiento animal, factor de crecimiento epidérmico (EGF), interleuquina-1 (IL-1) alfa trombina humana, factor de crecimiento de transformación (TGF-beta), factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), y factores de crecimiento fibroblásticos (FGF, bFGF, etc.) también pueden estar incluidos en el implante modificado en superficie.

45

50

55

Todavía otros ejemplos de agentes y aditivos biológico que pueden incorporarse en la nanotopografía del implante médico son azúcares biocidas/bioestáticas tales como dextrano y glucosa; péptidos; secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos tales como antagonistas de leptina, antagonistas de receptores de leptina, y ácidos nucleicos de leptina antisentido; vitaminas; elementos inorgánicos; cofactores de síntesis de proteínas; terapias de anticuerpos, tales como Herceptin®, Myllotarg®, y Erbitux®; hormonas; tejido endocrino o fragmentos de tejidos endocrinos;

60

sintetizadores; enzimas tales como colagenasa, peptidasas y oxidasas; armazones de células de polímeros con células parenquimales; agentes angiogénicos: agentes antigénicos; agentes citoesqueléticos; fragmentos de cartílagos; células vivientes tales como condrocitos, células de médula ósea, células pluripotenciales mesenquimales, extractos naturales, células vivientes genéticamente obtenidas, células vivientes modificadas de otro modo, tejidos autógenos tales como sangre, suero, tejido blando, y médula ósea; bioadhesivos; factor quimotáctico de ligamento periodontal (PDLGF); somatotropina; digestores óseos; agentes antitumorales y compuestos quimioterápicos tales como cis-platino, ifosfamida, metotrexato, e hidroclicloruro de doxorubicina; inmunosupresores; intensificadores de permeación tales como ésteres de ácidos grasos que incluyen monoésteres laureato, miristato y estearato de polietilenglicol; bifosfonatos tales como alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, (3-amino-1-hidroxipropilideno)-1,1-bisfosfonato (APD), bisfosfonato de diclorometileno, aminobisfosfonatezolendronato, y pamidronato; analgésicos y antiinflamatorios tales como medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) similares a trometamina ketorolaco, hidroclicloruro de lidocaína, hidroclicloruro de bipivacaina, e ibuprofeno; antibióticos y fármacos antirretrovirales tales como tetraciclina, vancomicina, cefalosporina, eritromicina, bacitracina, neomicina, penicilina, polimixina B, biomicina, cloromicetina, estreptomina, cefazolina, ampicilina, azactam, tobramicina, clindamicina, gentamicina, y aminoglicósidos tales como tobramicina y gentamicina; y sales tales como sal de estroncio, sal fluoruro, sal de magnesio, y sal de sodio.

Los ejemplos de agentes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, tobramicina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, anfotericina B, ampicilina, ampicilina/sulbactam, atovaquona, azitromicina, cefazolina, cefepina, cefotaxima, cefotetan, cefpodoxima, ceftazidina, ceftizoxima, ceftriaxona, cefuroxima, axetil cefuroxima, cefalexina, cloranfenicol, clotrimazol, ciprofloxacina, claritromicina, clindamicina, dapsona, dicloxacilina, doxiciclina, eritromicina, fluconazol, foscarnet, ganciclovir, atifloxacina, imipenem/cilastatina, isoniazida, itraconazol, ketoconazol, metronidazol, nafcilina, nistatina, penicilina, penicilina G, pentamidina, piperacilin/tazobactam, rifampina, quinupristin-dalfopristina, ticarcilin/clavulanato, trimetoprima/sulfametoxazol, valaciclovir, vancomicina, mafenida, sulfadiazina de plata, mupirocina, nistatina, triamcinolona/nistatina, clotrimazol/betametasona, clotrimazol, ketoconazol, butoconazol, miconazol, y tioconazol.

Los agentes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, interferón- $\alpha$ , inhibidores de COX-2, antagonistas de integrina, angiostatina, endostatina, trombospondín-1, vitaxina, celecoxib, rofecoxib, ITE-522, EMD-121974, y D-2163, inhibidores de quinasa FGFR, inhibidores de quinasa EGFR, inhibidores de quinasa VEGFR, inhibidores de metaloproteína de la matriz, marmiastat, prinomastat, BMS275291, BAY12-9566, neovastat, rhuMAb VEGF, SU5416, SU6668, ZD6474, CP-547, CP-632, ZD4190, talidomida y análogos de talidomida, escualamina, celecoxib, ZD6126, TNP-470, y otros fármacos inhibidores de angiogénesis.

En general el agente bioactivo que eluyen los nanotubos puede eluir el agente bioactivo al tejido circundante por colocación del implante en el paciente durante un período que varía de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 3 meses o más, que incluye 5 minutos a aproximadamente 14 semanas, tales como aproximadamente 24 horas, 72 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 12 semanas, o más.

En realizaciones más nuevas, en que es deseable modular las cinéticas de liberación de los agentes bioactivos que se eluyen desde los nanotubos, un polímero adecuado sintético o natural se combina con el agente bioactivo antes o al mismo tiempo en que los nanotubos se cargan con el agente bioactivo. Los polímeros adecuados sintéticos y naturales incluyen, pero no se limitan a, polímeros biodegradables o bioerosionables, tales como poli(DL-lactida-co-glicolida) (PLGA), poli(DL-lactida-co- $\epsilon$ -caprolactona) (DLPLCL), o poli( $\epsilon$ -caprolactona)(PLC), colágeno, gelatina, agarosa, y otros materiales naturales biodegradables.

Las superficies de nanotubos minerales con o sin péptidos que favorecen la adhesión y/u otros agentes biológicos, pueden ser densificados o estructurados y utilizados solos para formar un implante. Alternativamente, un sustrato estructurado puede revestirse con una composición que comprende los nanotubos con o sin péptidos que favorecen la adhesión. Los sustratos incluyen cualesquiera sustratos convencionales para implantes médicos o para otros tipos de implantes conocidos en la técnica.

También se proporciona (no según la invención) un método de tratamiento de un paciente necesitado de un implante médico que comprende las etapas de seleccionar el implante médico en donde el implante comprende nanotubos revestidos en la superficie y colocando el implante en el paciente. Los Implantes ejemplares incluyen, implantes ortopédicos, implantes dentales, implantes cardiovasculares, tales como un marcapasos artificial, implantes neurológicos, implantes neurovasculares, implantes gastrointestinales, implantes musculares, implantes oculares, y similares.. En esta realización de la invención el término "seleccionar" significa, por ejemplo, adquisición, elección o proporción del implante en vez de preparación del implante.

El método puede emplearse tanto para medicina clínica humana como para aplicaciones veterinarias. Por tanto, el paciente puede ser humano o, en el caso de aplicaciones veterinarias, puede ser un animal de laboratorio, agrícola, doméstico o un animal salvaje. La presente invención puede aplicarse a animales que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales de laboratorio tales como simios y chimpancés, animales domésticos tales como perros y

gatos, animales agrícolas tales como vacunos, caballos, cerdos, ovejas, cabras, y animales salvajes en cautividad tales como osos, pandas, leones, tigres, leopardos, elefantes, cebras, jirafas, gorilas, delfines, y ballenas.

5 En otra realización (no según la invención) se proporciona un método para intensificar la oseointegración de un implante ortopédico. El método comprende las etapas de seleccionar el implante ortopédico en donde el implante comprende nanotubos revestidos en la superficie y la colocación del implante en un paciente. En esta realización de la invención el término "seleccionar" significa, por ejemplo, adquisición, elección, o proporción del implante en vez de la preparación del implante. El paciente puede ser un ser humano o, en el caso de aplicaciones veterinarias, puede ser un animal de laboratorio, agrícola, doméstico o un animal salvaje.

10 La intensificación de la oseointegración es el aumento de oseointegración comparado con el obtenido con materiales de implante convencionales. La oseointegración intensificada puede demostrarse por la adhesión aumentada de osteoblastos, la proliferación aumentada de osteoblastos, la deposición aumentada de calcio, los ensayos de la actividad enzimática, o mediante cualquier otro método reconocido en la técnica empleado para detectar oseointegración.

15 Todavía en otra realización se proporciona un método de preparación de un implante médico. El método comprende la etapa de formación de una composición que comprende nanotubos. El método puede comprender, además, la etapa de revestir un sustrato con la composición que contiene nanotubos. La composición formada puede ser una composición que contiene los nanotubos solos, una composición de nanocompuestos, una composición de nanocompuestos que contiene un péptido que favorece la adhesión, o cualquier otra composición que contiene nanotubos que es adecuada para emplear según la presente invención.

## 20 *Kits*

25 Se proporcionan también kits de empleo en relación con la invención sujeto. La superficie o película anteriormente descrita que comprende nanotubos que comprenden un agente bioactivo para elución al tejido circundante por colocación en un sujeto, así como también implantes médicos que incluyen la superficie o película, pueden proporcionarse en kits, con instrucciones adecuadas con objeto de llevar a cabo los métodos descritos anteriormente. El kit contendrá normalmente en recipientes separados los nanotubos o los materiales necesarios para proporcionar el revestimiento nanotubular sobre una superficie. Las instrucciones (p.ej., escritas, en cinta, VCR, CD-ROM, etc.) para llevar a cabo los métodos, habitualmente estarán incluidas en el kit. El kit puede contener asimismo, dependiendo del método particular, otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones y similares).

30 Las instrucciones se registran generalmente en un medio de registro adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden imprimirse en un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Por tanto, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como una inserción del envase, en la etiqueta del recipiente del kit o componentes del mismo (p.ej., asociadas con el envasado o subenvasado), etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible de un ordenador adecuado, p.ej., CD-ROM, disquete, etc., incluyendo el mismo medio sobre el que se presenta el programa. .

35 Todavía en otras realizaciones, las instrucciones no están por sí mismas presentes en el kit, si no medios para obtener las instrucciones procedentes de una fuente remota, p.ej., vía Internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección web donde las instrucciones pueden verse de o de donde las instrucciones pueden descargarse.

40 Todavía más, el kit puede ser uno en el que se obtienen las instrucciones descargadas de una fuente remota, como en Internet o www (world wide web). Puede emplearse alguna forma de protocolo de seguridad o de identificación de acceso, para limitar el acceso a aquellos autorizados para el uso de la invención sujeto. Como con las instrucciones, los medios de obtener las instrucciones y/o la programación se registran generalmente en un medio de registro adecuado.

## 45 **Ejemplos**

50 Los ejemplos que siguen no están según la invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud en lo que respecta a los números utilizados (p.ej., cantidades, temperatura etc.) pero deben tenerse en cuenta para ello algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura está en grados Centígrados, y la presión está en la presión atmosférica o cerca de ella.

## Métodos y materiales

En los Ejemplos que figuran más adelante se emplearon los siguientes métodos y materiales.

## Fabricación de superficies nanotubulares de titania.

- 5 Se fabricaron superficies nanotubulares de titania utilizando un proceso de anodización descrito en otro lugar (Mor et al., *Advanced Functional Materials* 2005, 15:1291-96; Varghese et al., *Journal of Materials Research* 2003, 18:156-155). Brevemente, hojas de titanio (Alfa Aesar) de grosor 0,25 mm y pureza 99,8% se emplearon para fabricar nanotubos de titania. El electrolito estaba constituido por ácido fluorhídrico al 0,5% en volumen (J. T. Baker) en agua, y un electrodo de platino (Alfa Aesar) que servía de cátodo. La anodización se realizó con un voltaje constante de 20 V durante 45 minutos. Las muestras se limpiaron utilizando agua desionizada después de completar el
- 10 proceso de anodización. Los nanotubos se sometieron luego a sinterización a 500°C en oxígeno anhidro como es sabido que esos ambientes influyen en la transformación de fase de titania. Las morfologías de las superficies de las muestras se estudiaron utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido Sirión,(SEM). .

## Aislamiento y cultivo de células estromales medulares (MSC)

- 15 Se obtuvieron ratas Lewis macho del Laboratory of Animal Resource Center (LARC) de la Universidad de California, San Francisco. Los animales se sometieron a eutanasia según un protocolo aprobado por IACUC. Se separaron los limbos asépticamente y se colocaron en solución tamponada de fosfato fría (PBS) en tubos Falcón de 50 ml. Se diseccionaron huesos procedentes de los tejidos blandos en una cabina de cultivo celular. Los extremos metafísicos de los huesos se separaron para permitir el acceso a la cavidad medular. Los contenidos de cavidad medular se pusieron al descubierto utilizando una aguja de calibre 25 fijada a una jeringuilla de 10 ml que contenía MEM
- 20 modificado en alfa ( $\alpha$ MEM) suplementado con FBS al 10% y penn/strep (penicilina/estreptomicina) al 1%. La suspensión celular descubierta se filtró luego a través de un filtro de nilón de 70  $\mu$ m. Con objeto de sembrar células sobre superficies nanotubulares (1 cm X 1 cm), las superficies se adhirieron al fondo de placas de 12 pocillos, con silicona de calidad médica (Dow) y se curaron durante la noche, Las placas se colocaron luego bajo luz ultravioleta en una cabina biológica durante 30 minutos. Antes de sembrar las células, las superficies fueron humedecidas con etanol de 70% durante 30 minutos para esterilización. Las superficies se lavaron entonces dos veces con PBS a baja temperatura y las células se depositaron en placa en una densidad de 5 X 10<sup>6</sup> por pocillo. El día 4 de cultivo, la mitad de los medios se separó y se reemplazó con  $\alpha$ MEM de nueva aportación suplementado con FBS al 10% y penn/strep al 1%. El día 7 de cultivo todos los medios se retiraron y las células se suministraron con los medios completos. Los Medios completos incluyen  $\alpha$ MEM suplementado con FBS al 10%, Penn/Strep al 1%,
- 25 Dexametasona (concentración final 10<sup>-8</sup>M), ácido Ascórbico (50  $\mu$ g/ml final) y fosfato de beta-glicerol (8 mmol final). El medio se cambió después cada dos días para la duración del experimento. La respuesta celular se investigó en dos etapas (a) adhesión y proliferación celular hasta 7 días después de la fase de cultivo inicial, y (b) diferenciación celular durante hasta 3 semanas después de proporcionar medios completos (es decir, después de 7 días desde el cultivo inicial). Se utilizaron como tipos titanio y poliestireno de cultivo de tejidos de que se dispone en el comercio.

## 35 Adhesión y proliferación de MSC

Se investigó la adhesión de MSC 1 día después de sembrar las células y la proliferación se investigó después de los días 4 y 7. Las células adheridas y proliferadas se cuantificaron tripsinizando las células situadas en las superficies y contándolas utilizando un hemacitómetro

## Viabilidad celular

- 40 La viabilidad celular se investigó 4 días después de sembrar las células utilizando un ensayo de MTT de que se dispone en el comercio (Sigma). El método MTT es sencillo, exacto y rinde resultados reproducibles. El componente fundamental es (bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) o MTT. Las soluciones de MTT, disueltas en soluciones salinas medias o equilibradas sin rojo de fenol, tienen un color amarillento. Las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables dividen el anillo de tetrazolio, produciendo cristales de formazán de color
- 45 púrpura. Se siguió el protocolo tipo proporcionado con el kit de MTT. La solución de color púrpura que resultó se midió espectrofotométricamente a 570 nm empleando un espectrofotómetro, Un aumento o una disminución del número de células dio por resultado un cambio concomitante con la cantidad de formazán formado, lo que indica el grado de citotoxicidad ocasionado por las superficies.

## Tinción con calceína

- 50 Al cabo de 7 días de cultivo, las células existentes sobre las superficies se tiñeron con calceína. La calceína, colorante polianiónico, queda bien retenida dentro de las células vivas, produciendo así una fluorescencia verde uniforme intensa en las células vivas. Las superficies se lavaron dos veces con PBS antes de la tinción. Se incubaron en solución de calceína 2  $\mu$ M durante 30-45 minutos. Las superficies se sometieron a formación de imágenes empleando un microscopio de fluorescencia después de lavar con PBS.

55

#### Contenido total de proteína intracelular

El contenido total de proteína de MSCs es sumamente importante dado que es la indicación de crecimiento conveniente y de respuesta normal de las células en medios ambiente nanotubulares. Por tanto, se midió la cantidad de proteína producida por las células a las 3 semanas de cultivo después de proporcionar medios completos. Con objeto de liberar la proteína intracelular, las células adheridas sobre los sustratos se sometieron a lisis en agua desionizada empleando un método estándar de cuatro ciclos de congelación-descongelación. La solución de lisado que resultó se utilizó después para el análisis. El contenido total de proteína se determinó mediante un kit de ensayo con BCA (ácido bicinonínico) (Pierce) y la absorbancia de la solución se midió empleando un espectrofotómetro en una longitud de onda de 570 nm. La absorbancia se convirtió luego en contenido de proteína utilizando una curva tipo de albúmina para determinar la cantidad de proteína intracelular.

#### Actividad de fosfatasa alcalina

La actividad ALP es un parámetro importante para tener acceso a la funcionalidad normal de células situadas sobre una superficie; por tanto la actividad se valoró a 3 semanas después de la provisión de medios completos. La solución de lisado que resulta se empleó para medir la actividad ALP utilizando un ensayo colorimétrico del que se dispone en el comercio (Teco). La absorbancia de la solución se midió utilizando un espectrofotómetro en una longitud de onda de 590 nm. La absorbancia se convirtió luego en concentración empleando un patrón de ALP y todos los resultados obtenidos se normalizaron con contenido total de proteína para tener en cuenta los cambios en el número de células presentes en cada superficie.

#### Análisis de contenido de calcio

El contenido de calcio se valoró a las 3 semanas del cultivo empleando un ensayo colorimétrico (Teco). Una vez desprendido el lisado, las superficies se remojaron durante la noche en solución de HCl 6N para disolver el calcio precipitado. La solución de calcio se hizo reaccionar luego con reactivos para el ensayo y la solución se midió fotométricamente a 570 nm. La absorbancia se convirtió después en concentración utilizando patrones de calcio y todos los resultados obtenidos se normalizaron con contenido total de proteína para tener en cuenta los cambios en el número de células presentes en cada superficie.

#### Producción de matriz extracelular

El calcio y el fósforo son los componentes principales de la matriz ósea. Si las células se han diferenciado en las superficies, comenzarán a depositar matriz ósea. Con objeto de detectar la presencia de calcio y fósforo sobre nuestras superficies, las muestras fueron secadas al aire para el análisis XPS. XPS es una técnica sensible a las superficies y detecta niveles indicio de elementos presentes en la superficie. Se recogieron espectros de estudio desde 0 a 1100 eV utilizando un espectrómetro de XPS Monocromatizado S-Probe de SSI con una fuente de cota pequeña de rayo de Al-K $\alpha$ -X (1486, 6 eV) y un detector de multicanales con una energía de paso de 160 eV. Los resultados obtenidos por ciento de composición atómica y de razones atómicas del calcio y fósforo depositados sobre superficies de alúmina durante hasta tres semanas de cultivo, se calcularon de las exploraciones estudiadas utilizando el software suministrado por el fabricante.

#### Morfología de las células

La morfología de las células sobre superficies nanotubulares y testigo se examinó empleando SEM. Las superficies se sometieron a formación de imágenes al cabo de 1, 4 y 7 días de cultivo para investigar la etapa de adhesión y proliferación; y después de 1, 2 y 3 semanas de cultivo después de proporcionar los medios completos. Antes de formar las imágenes las células se fijaron y deshidrataron. Las superficies se lavaron dos veces en PBS y luego se remojaron en el fijativo primario de glutaraldehído al 3% (Sigma), cacodilato sódico 0,1 M (Polysciences), y sacarosa 0,1 M (Sigma, ST. Louis MO) durante 45 minutos. Las superficies se sometieron a dos lavados de cinco minutos con un tampón que contenía cacodilato sódico 0,1 M y sacarosa 0,1 M. Después las células se deshidrataron reemplazando el tampón con concentraciones crecientes de etanol (35, 50, 70, 95 y 100 %) durante diez minutos cada una. Después, las células se secaron reemplazando el etanol por hexametildisilazano (HMDS) (Polysciences) durante 10 minutos. El HMDS se retiró y las superficies se secaron al aire durante 30 minutos. La obtención de imágenes SEM se realizó en el Microscopio Electrónico de Barrido Sirion en voltajes que variaban de 10-20 kV después de que las superficies se revistieran por chisporroteo en oro. El revestidor de chisporroteo se fijó en una corriente de 20 mA y una presión de 0,05 mbar durante veinte segundos para depositar una capa de oro de 10 nm.

#### Respuesta inmunitaria in vivo de superficies nanotubulares de titania

Dos ratas Lewis macho, de aproximadamente 225 g, fueron anestesiadas en una cámara de inducción con isoflurano al 3% y se mantuvieron entonces en isoflurano al 1,5% en una máscara olfativa ajustada durante el curso de la cirugía. Los animales se pinzaron y prepararon siguiendo técnicas asépticas descritas en las pautas de IACUC. Se hizo una incisión de 1 cm de línea media de la región de pescuezo del cuello. Los discos de implante de muestras (5 mm de diámetro y 1 mm de grosor) fueron esterilizados por calentamiento en autoclave. La capa de piel se desprendió de la capa muscular formando un bulto sobre cada lado de la incisión, donde estaban colocadas las superficies. Se implantaron dos muestras en cada animal haciendo un total de 4 muestras (2 de titania nanotubular y

2 de testigo de titanía). La capa de piel se suturó luego con sutura de nilón 4.0. Se dejó que los animales se recuperaran antes de devolverles a la instalación de animales. Los animales fueron monitorizados cada día durante la primera semana y dos veces por semana después hasta 4 semanas. Se separaron los puntos de sutura de nilón después de una semana. Al cabo de 4 semanas, los animales se anestesiaron según se ha descrito anteriormente.

5 Se hizo una incisión en la línea media en la región del pescuezo del cuello. La capa de piel se levantó para exponer los implantes que luego se recuperaron juntamente con el tejido circundante. Los animales se sacrificaron por separación cardíaca.

Directamente, después de la eutanasia, los implantes recuperados con los tejidos circundantes fueron fijados en solución de formaldehído tamponada con fosfato al 4%. Seguidamente, las muestras se deshidrataron e incrustaron en medios de incrustación de Spurr. Después de la proliferación, se obtuvieron secciones de 300  $\mu\text{m}$  de grosor que contenían interfase de tejido/implante utilizando una sierra de diamante de velocidad lenta (sierra Isomet de Buehler) Las secciones se molieron luego utilizando papel de lija de 400 y 600 polvos en un molino de ruedas (molino Ecomet III de Buehler) hasta obtener un grosor final de 50  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina..

10

#### Análisis estadístico

15 Cada uno de los experimentos se reconfirmó al menos tres veces empleando células procedentes de diferentes preparaciones estromales medulares. Todos los resultados se analizaron utilizando análisis de varianza /ANOVA). La significación estadística se consideró en  $p < 0,05$ .

#### Relleno de nanotubos

Los nanotubos se rellenaron empleando un método simplificado de liofilización (Foraker et al., Pharm Res 20(1):110-6 (2003); Salonen et al., J Control Release 108(2-3):362-74 (2005). En breve, se prepararon 100 mg/ml de soluciones de BSA en PBS (pH 7.1) y de LYS en tampón de acetato sódico (50 mM, pH 4,5). Las superficies de titanía de los nanotubos (0,5 cm X 0,5 cm) se limpiaron con agua desionizada antes de la carga de BSA y LYS. Se midió con pipeta 1  $\mu\text{l}$  de la solución de proteína existente sobre la superficie de los nanotubos y se esparció suavemente para asegurar un revestimiento uniforme. Las superficies se dejaron secar después en vacío a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de secar, se repitió la etapa de carga hasta que estaba presente la cantidad apropiada de proteína en la serie de nanotubos. De este modo las superficies se cargaron con 200, 400 y 800  $\mu\text{g}$  de proteína. Después de la etapa final de secado las superficies se enjuagaron rápidamente pipeteando 500  $\mu\text{l}$  de PBS sobre la superficie para retirar el exceso de proteína existente sobre la superficie. Las soluciones de lavado se recogieron y se guardaron para su análisis posterior. Se utilizaron como testigo superficies de los nanotubos que habían adsorbido la misma concentración de proteína. La adsorción se efectuó incubando las superficies durante 20 minutos siguiendo con limpieza con PBS.

20

25

30

#### Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X.

Para evaluar las diferencias en cantidades de proteína en los nanotubos, se llevó a cabo un análisis por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). XPS es una técnica sensible de las superficies que puede detectar cambios en la composición de una superficie de hasta 2-20 capas atómicas, dependiendo del material. Dado que los nanotubos tienen aproximadamente una longitud de 400 nm, pudo utilizarse XPS para verificar las diferencias en las concentraciones de las superficies debidas a diferentes cantidades de BSA y LYS cargadas. Las superficies de los nanotubos cargadas junto con las superficies adsorbidas se montaron en una fase de XPS. Se analizaron tres lugares por muestra. Los análisis se realizaron en un espectrómetro de XPS monocromatizado S-Probe de SSI que emplea una fuente de rayos  $\text{Al-K}\alpha\text{-X}$  (1.486,6 eV) con una lente de área pequeña Focus III de Omni y un detector multicanales. Un analizador hemisférico concéntrico (CHA) se hizo actuar en el modo de transmisión constante del analizador para medir las energías de unión de los fotoelectrones emitidos. La escala de energías de unión se calibró mediante el pico  $\text{Au}4f_{7/2}$  en 83,9 eV, y la linealidad se verificó mediante los picos  $\text{Cu}3p_{1/2}$  y  $\text{Cu}2p_{3/2}$  en 76,5 y 932,5 eV, respectivamente. Se recogieron espectros de estudio desde 0 a 1100 eV con energía de paso de 160 eV, y se recogieron también espectros C1s de resolución alta para cada elemento detectado con energía de paso de 10 eV. Se recogieron espectros de estudio y de resolución alta se recogieron en un ángulo limitado de 65°, definido como el ángulo de luz diseminado por el parche electrónico para el analizador y la superficie de la muestra. A todos los espectros se dio referencia fijando el pico C1s de hidrocarburo en 285,0 eV para compensar los efectos residuales de la carga. Los resultados de la composición atómica y de las razones atómicas se calcularon utilizando el factor de sensibilidad suministrado por el fabricante.

35

40

45

50

#### Liberación de nanotubos

Con objeto de liberar las proteínas procedentes de los nanotubos, las superficies se sumergieron en 500  $\mu\text{l}$  de PBS en una placa de 24 pocillos, a temperatura ambiente, con agitación orbital a 70 rpm. Se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de muestras después de intervalos específicos de tiempo para determinar las cinéticas de la liberación. Se recogieron muestras periódicamente durante hasta 120 minutos. La solución se reemplazó con 200  $\mu\text{l}$  de PBS de nueva aportación cada vez que se tomaban las muestras. Las muestras se analizaron por el contenido de proteína utilizando un kit de ensayo Micro-BCA del que se dispone en el comercio, y la concentración se ajustó según las diluciones debido al reemplazo de PBS de nueva aportación.

55

## Ejemplo 1

## Fabricación de implantes revestidos en la superficie nanotubular

Los resultados exponen el desarrollo de superficies nanotubulares que pueden aplicarse a implantes que existen, proporcionando con ello una estrategia que puede aplicarse bastante rápidamente en el medio ambiente médico. El enfoque para conseguir una nanoarquitectura óptima del material utiliza una técnica de anodización sencilla para fabricar disposiciones de nanotubos de titania orientados verticalmente, inmovilizados, de razón de aspecto elevado, La FIG. 1 muestra una imagen SEM de nanotubos de titania con un tamaño de poro de aproximadamente 80 nm y una longitud de 400 nm, preparados utilizando un voltaje de anodización de 20 V durante 20 minutos. Puede apreciarse que la disposición de nanotubos es sustancialmente uniforme a lo largo de la superficie de sustrato. Existe una correlación precisa entre el voltaje de anodización y el tamaño de los poros, por lo que variando el voltaje y el tiempo de anodización pueden obtenerse sustratos con escalas de tamaños diferentes (Mor et al., *Journal of Materials Research* 2003, 18(11):2588-93; Rougraff et al., *J Bone Joint Surg Am* 2002, 84-A(6):921-9). La zona superficial grande de la estructura de la disposición de los nanotubos y la aptitud para afinar precisamente el tamaño de los poros, el grosor de la pared, y la longitud de los nanotubos para optimizar las propiedades de las medidas biológica están entre las muchas propiedades deseables de esta arquitectura para poder emplearles en aplicaciones ortopédicas.

Las superficies de titania nanotubulares producidas se sembraron con células estromales medulares obtenidas de ratas Lewis macho. Los extractos de médula ósea que contienen osteoprogenitores combinados con varias matrices han puesto de manifiesto que aceleran e intensifican la formación de hueso sin defectos óseos en comparación con la matriz aislada (Rougraff et al., *J Bone Joint Surg Am* 2002, 84-A(6):021-9; Tiedeman et al., *Orthopedics* 1995, 18(12):1153-8). Las MSCs contienen una población pluripotente de células capaces de diferenciación a lo largo de linajes mesenquimatosos múltiples (p.ej., hueso (Haynesworth et al., *Bone* 1992, 13(1):81-8; Prockop et al., *Science* 1997, 276(5309):71.4), ligamentos (Altman et al., *Faseb J* 2002:16(2):270-2), tejido adiposo (Beresford et al., *J Cell Sci* 1992;192(Pt 2):341.51); cartílagos (Wakitani et al., *J Bone Joint Surg A* 1994, 76(4):579-92) y tejido muscular ((Seshi et al., *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26(3):234-46)). Debido a que las técnicas de cultivo de tejidos manifiestan el aislamiento y expansión ex vivo de esta población de células procedente de animales, estas células representan una fuente celular osteogénica para emplear para evaluar su interacción con superficies nanoestructuradas. La capacidad de MSCs para inducir formación ósea in vivo se opina que es debido a la interacción de osteoprogenitores presentes dentro de las poblaciones de células con factores osteoinductivos, tales como proteínas morfogenéticas de hueso y diversos factores de crecimiento y citoquinas que les hacen diferenciarse, en células que forman hueso, es decir, osteoblastos, que eventualmente después forman una matriz ósea. Se utilizaron como testigos titanio puro y poliestireno de cultivo de tejidos de que se dispone en el comercio.

Es necesaria una unión importante a las superficies con objeto de que las MSCs se desplieguen y se diferencien. Determinando la unión inicial de MSCs en las superficies nanotubulares, puede examinarse la correlación de la unión celular y las propiedades físicas y mecánicas de la armazón. El contacto y las interacciones entre células afectarán eventualmente al proceso de diferenciación. Por tanto, se investigó la adhesión y proliferación de las células sobre superficies de titania nanotubulares, y se comparó con las procedentes de titanio y poliestireno. La FIG. 2, parte a, expone los resultados de adhesión de MSC después de 1 día y la proliferación después de 4 y 7 días de cultivo de las células. Como era de esperar, el poliestireno apoyó la máxima adhesión y proliferación de las células. No obstante, los resultados indicaron un aumento de 40% en el número de células presentes en superficies de titania nanotubulares en comparación con superficies de titania planas ( $p < 0,05$ ) al cabo de 7 días de cultivo. Los resultados ponen de manifiesto que las indicaciones topográficas en nivel de nanoescalas presentes sobre las superficies de titania nanotubulares favorecen la adhesión y proliferación de las células.

La mayor adhesión sobre la superficie no sugiere necesariamente que las células sean viables y funcionales. Por tanto, la viabilidad celular se determinó también utilizando el ensayo de MTT. La FIG.2, parte b, muestra los valores de absorbancia obtenidos para células adheridas a superficies durante 4 días. Los resultados muestran que las células son viables sobre superficies de titania nanotubulares así como sobre superficies de titanio y poliestireno.. Los valores de las absorbancias para superficies nanotubulares y de titanio son similares a los obtenidos de poliestireno. El poliestireno se emplea comúnmente como control positivo del cultivo de células. Por tanto la semejanza entre los valores de las absorbancias manifiesta que las células están sanas y son viables sobre las tres superficies. Después de 7 días de cultivo (justamente antes de proporcionar los medios completos) las células se tiñeron con calceína. La tinción con calceína es fluorescente basado el método de tinción para determinar la viabilidad celular. Es un indicador más rápido, menos costoso y más sensible de acontecimientos citotóxicos. Las células vivas se distinguen por la presencia de actividad de esterasa intracelular, determinada por la conversión enzimática de la calceína que penetra en las células virtualmente no fluorescentes para la calceína intensamente fluorescente. La calceína colorante polianiónico es bien retenida dentro de las células vivas, produciendo en las células vivas una fluorescencia verde uniforme. La FIG. 3, partes a y b, expone imágenes de MSCs de microscopía de fluorescencia sobre superficies de titanio y nanotubulares, respectivamente, teñidas con calceína. Las imágenes muestran que las células son viables sobre estas superficies después de 7 días de cultivo. Además, una inspección más estrecha de células sobre superficies nanotubulares revela la formación de agrupaciones, que es un comportamiento fenotípico normal de MSCs. Este comportamiento está ausente en superficies de titanio lisas, lo que muestra que las superficies nanotubulares están proporcionando un microambiente favorable para las MSCs.

Se investigó la morfología de MSC sobre superficies de titanio y superficies de titanio nanotubulares utilizando SEM. La FIG. 4 muestra imágenes SEM después de 1, 4 y 7 días de cultivo sobre superficies de titanio y nanotubulares. Como era de esperar, las células eran esféricas después del día 1 tanto sobre superficies de titanio como sobre superficies nanotubulares (FIG. 4, partes a y b, respectivamente). Después de 4 días de cultivo las MSCs ponen de  
 5 manifiesto todavía una morfología esférica sobre superficies de titanio (FIG. 4, parte c); sin embargo exponen una morfología que se extiende sobre las superficies nanotubulares (FIG. 4, parte d). El día 7, las MSCs sobre superficies de titanio están aisladas todavía con una propagación mínima (FIG. 4, parte e), mientras que las MSCs sobre superficies de nanotubos han formado un enrejado indicativo de comunicación de célula con célula (FIG. 4, parte f). Estos resultados exponen que las MSCs son capaces de propagarse más rápidamente sobre superficies nanotubulares en comparación con las superficies de titanio dentro de 7 días de cultivo. Se tomaron imágenes SEM con  
 10 ampliación alta al cabo de 7 días sobre superficies nanotubulares para visualizar las extensiones celulares. La FIG. 4, partes g y h, muestran imágenes SEM de la ampliación alta de una extensión de MSC que investiga la arquitectura nanotubular. La longitud de la extensión es muchas veces mayor que el diámetro de las células. Estas extensiones ayudan al propio anclaje de las células a la estructura nanotubular. Haciendo esto, las células pueden adherirse y propagarse sobre la superficie, dando por resultado una diferenciación intensificada a largo plazo.

Después de 7 días de cultivo sobre superficies de titanio y de titanio nanotubulares, las MSCs fueron provistas de medios completos para iniciar diferenciación y deposición de matriz. Se midió la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) durante hasta 3 semanas de cultivo después de proporcionar medios completos. Los niveles de ALP son dependientes de la edad; no obstante, los niveles se elevan durante el período de crecimiento óseo activo, y por tanto se midieron. Se empleó un ensayo colorimétrico para medir los niveles de ALP. La FIG. 5. parte a, expone la actividad de ALP normalizada con contenido total de proteína para tener en cuenta la diferencia en el número de células presentes sobre cada superficie. Las células presentes sobre superficies nanotubulares muestran niveles mayores de ALP en comparación con los de las superficies de titanio. Hay, aproximadamente, un aumento de 50% en los niveles de ALP sobre las superficies nanotubulares después de 3 semanas de cultivo ( $p < 0,05$ ).

A medida que las células se diferencian, empiezan a depositar matriz ósea sobre la superficie. La matriz ósea consiste predominantemente de fosfato de calcio. Por tanto, la cantidad de calcio y de fósforo de las superficies puede medirse utilizando espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). XPS es una técnica sensible a las superficies y detecta la presencia de cantidades indicio de elementos sobre la superficie. La Tabla 1 muestra las razones de concentraciones atómicas de calcio y fósforo con respecto a las de titanio obtenidas por exploraciones de inspección de superficies de titanio y nanotubulares durante hasta 3 semanas de cultivo. Los resultados exponen un aumento regular de las cantidades de calcio y fósforo sobre superficies nanotubulares. comparado con un aumento insignificante sobre superficies de titanio Este hecho corresponde a una mayor deposición de matriz ósea sobre superficies nanotubulares en comparación con superficies de titanio. Además, el calcio depositado en todas las superficies se disolvió en ácido clorhídrico y su concentración se midió haciendo uso de un ensayo colorimétrico. El calcio reacciona con complexona de cresoltaleína en el seno de 8-hidroxiquinolina formando una coloración púrpura que después se midió fotométricamente. La FIG. 5, parte b, muestra la concentración de calcio normalizada con respecto al contenido total de proteína teniendo en cuenta la diferencia del número de células sobre cada superficie. Estos resultados se correlacionan estrechamente con los resultados obtenidos procedentes de XPS. De nuevo, existe aproximadamente un aumento de 50% en el contenido de calcio sobre superficies nanotubulares comparado con el de las superficies de titanio durante hasta 3 semanas de cultivo ( $p < 0,05$ ). Estos resultados ponen de manifiesto que las superficies nanotubulares proporcionan una interfase favorable de diferenciación de MSC y la producción de matriz.

Tabla 1

	Ca/Ti		P/Ti	
	Titanio	Nanotubos	Titanio	Nanotubos
Semana 1	0,31	0,32	0,37	0,41
Semana 2	0,32	0,56	0,42	0,78
Semana 3	0,34	1,21	0,44	1,65

Se investigó la morfología de MSCs durante la fase de diferenciación en superficies nanotubulares empleando SEM. La FIG. 6 muestra imágenes SEM de MSCs sobre superficies nanotubulares de hasta 3 semanas de cultivo. Las células manifiestan una morfología de propagación y una formación reticular en la superficie al cabo de 1 semana de cultivo (FIG. 6, parte a). Las imágenes SEM de ampliación alta muestran la presencia de un material granular sobre la superficie nanotubular (FIG.6, parte b). Después de 2 semanas las imágenes SEM muestran que la superficie completa está revestida con un retículo de células que se propagan bien (FIG. 6, parte c). Un examen más completo de las zonas que rodean las células confirma que los nanoporos se están llenado con matriz (FIG. 6, parte d). Al

cabo de 3 semanas de cultivo, las imágenes SEM muestran que la superficie completa está recubierta completamente con células y con componentes de matriz mineralizados (FIG.6, parte e) De nuevo una imagen SEM de ampliación alta de la zona que rodea las células muestra que las estructuras nanotubulares están completamente rellenas con un material poroso. Como se ha indicado previamente, el análisis XPS muestra que este material depositado estaba constituido predominantemente por calcio y fósforo, constituyentes importantes de la matriz ósea.

Es crucial el que cualquier material nuevo empleado para aplicaciones ortopédicas debe demostrar una biocompatibilidad apropiada. Por tanto, se investigó la biocompatibilidad in vivo de superficies de titanio y nanotubulares implantando subcutáneamente discos de titanio y de titanio nanotubulares. Al cabo de 4 semanas, los implantes se separaron y se evaluó la biocompatibilidad por análisis histológico del tejido que rodea el implante. La FIG. 7 muestra una imagen microscópica clara de secciones de tejido sano y del tejido que rodea el implante teñidos con hematoxilina y eosina. La FIG. 7, parte a, muestra secciones de histología de tejido sano. No hay tejido de cicatrices fibroso presente en los tejidos que rodean el implante de titanio y comparable con tejido sano (FIG. 7, parte b). Se sabe que el titanio es biocompatible y, por tanto, no debe ocasionar respuesta alguna inmunitaria indeseable in vivo. La FIG. 7, parte c, muestra imágenes microscópicas claras de secciones de tejidos que rodean el implante de titanio nanotubular. Con semejanza al titanio, no hay formación de tejido de cicatriz fibroso en torno al implante. El tejido aparece como sano y normal. Por tanto, estos resultados preliminares in vivo ponen de manifiesto que las superficies nanotubulares no causan respuesta inmunitaria adversa en condiciones in vivo.

El desarrollo de plataformas nanoestructuradas basado en nuevas películas de óxidos metálicos puede proporcionar discernimiento de las interacciones de material celular para el desarrollo de superficies de implantes mejoradas. Los resultados que se proporcionan en esta memoria, muestran que las superficies de titanio nanotubulares proporcionan un molde favorable para el crecimiento y la diferenciación de células óseas. Se prepararon superficies de titanio nanotubulares mediante un procedimiento sencillo de anodización y se utilizaron para investigar el comportamiento a corto y plazo largo de MSCs. Los resultados exponen que esas superficies apoyaron una mayor adhesión, proliferación y viabilidad de células hasta 7 días de cultivo en comparación con superficies de titanio. Las células cultivadas sobre superficies nanotubulares demostraron una mayor actividad ALP. Además, las concentraciones de calcio y fósforo eran 50% mayores sobre esas superficies mostrando que la deposición de la matriz estaba sobrerregulada en las superficies nanotubulares. Además, las superficies nanotubulares no ocasionan respuesta inmunitaria adversa en condiciones in vivo. Por tanto, los resultados exponen que la actividad osteoblástica puede intensificarse de modo importante utilizando nanotopografías controladas. Por consiguiente, la incorporación de tales nanoarquitecturas en superficies de implantes facilitará, además, el cultivo y el mantenimiento de estados de células diferenciadas, y favorecen la oseointegración a largo plazo.

Ejemplo 2

Fabricación de implantes nanotubulares revestidos en superficie que eluyen fármacos.

Se determinó seguidamente si los nanotubos pueden llenarse con antibióticos que podrían defender infecciones inmediatamente después de implantación (p.ej., gentamicina, diacetato de clorhexidina, ciprofloxacina) o con factores de crecimiento o proteínas terapéuticas (p.ej., TGF-β, IGF, BMP) que pueden ayudar a estimular la los procesos de diferenciación celular y de reparación ósea- En este estudio se emplearon albúmina de suero bovino (BSA) y lisozima (LYS) como proteínas modelo para investigar sus cargas y eficacias de liberación procedentes de arquitecturas de nanotubos. BSA es una molécula mas grande con una carga negativa neta a pH neutro en comparación con LYS que es más pequeña de tamaño con una carga positiva neta a pH neutro (Tabla 2).

Tabla 2

	Peso molecular (KDa)	Punto isoeléctrico pI	Carga neta a pH 7,0
Albúmina de suero bovino	67	4,7	-18
Lisozima	14	11	+7

Antes de realizar los estudios de liberación, fue importante evaluar la eficacia de carga de las proteínas sobre la superficie de los nanotubos. Las concentraciones de las soluciones original y de lavado se midieron empleando un kit de ensayo Micro-BCA de que se dispone en el comercio. La eficacia de carga se expresó como tanto por ciento de proteína cargada después de lavado. La eficacia de carga se calculó mediante la ecuación que sigue

$$\eta = \frac{C_o - C_L}{C_o} \quad (1)$$

donde η es la eficacia de carga

C<sub>o</sub> : concentración de proteína en la solución original

$C_L$  : Concentración de proteína en la solución de lavado.

La FIG. 8 expone eficacias de carga de nanotubos cargados con 200, 400 y 800  $\mu\text{g}$  de ambos, BSA y LYS. Los resultados muestran que aproximadamente 60-80% de proteína está retenida en los nanotubos después de lavado con independencia de la carga inicial.

- 5 Para evaluar las diferencias de cantidades de proteína en los nanotubos, se llevó a cabo un análisis por espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). La Tabla 3 muestra las razones de N/C computadas partiendo de barridos de estudio de XPS. Se emplearon como testigos superficies con LYS y BSA adsorbidas. Existe un aumento estacionario de razones de N/C con cantidades crecientes de proteína cargadas en los nanotubos. Un modo más preciso para caracterizar proteína sobre la superficie, consiste en determinar la fracción de picos de C-N y de N-C=O en el pico C1s global. Los picos de C-N y de N-C=O son característicos de las proteínas que están en un desplazamiento de 0,8 eV y 1,8 eV, respectivamente, del pico de C-C (285 eV). Por tanto, se realizaron exploraciones de C1s y el software de análisis de ajuste del pico, proporcionado con el instrumento XPS, se utilizó para determinar el % de C-N y de N-C=O del pico C1s global (Tabla 3). Se supuso una convolución de componentes de Gaussian para todos los picos. Existe un aumento de la intensidad de los picos de C-C, C-N y N-C=O con cantidades crecientes de proteínas cargadas en los nanotubos. Sin embargo, el estudio y barridos de C1s de alta resolución para superficies con BSA y LYS adsorbidas, ponen de manifiesto concentraciones de proteínas en la superficie significativamente más pequeñas. Estos resultados muestran que los nanotubos pueden cargarse con éxito con cantidades medidas de proteínas utilizando la técnica descrita en esta memoria.

Tabla 3

	Albúmina de suero bovino				Lisozima			
	Adsorbida	200 mg	400 mg	800 mg	Adsorbida	200 mg	400 mg	800 mg
N/C	0,123	0,188	0,233	0,268	0,215	0,245	0,268	0,297
C-C	0,81	0,71	0,51	0,40	0,73	0,53	0,32	0,21
C-N	0,11	0,18	0,24	0,20	0,22	0,29	0,35	0,40
N-C=O	0,08	0,11	0,25	0,40	0,03	0,18	0,31	0,30

- 20 .
- La FIG. 9 expone los resultados de liberación obtenidos con nanotubos cargados con 200, 400 y 800  $\mu\text{g}$  de BSA y LYS. La cantidad de proteína que eluyó se expresa en términos de fracción de proteína total liberada. Los resultados exponen que dos proteínas diferentes, una molécula negativa más grande (BSA, FIG: 9, partes A, B y C) y una molécula positiva más pequeña (LYS, FIG, 9, partes D, E y F), pueden liberarse fácilmente desde los nanotubos. Además, las cinéticas de liberación pueden alterarse cambiando la cantidad de proteína cargada. La Tabla 4 muestra los puntos de tiempo en que toda la proteína se ha liberados de los nanotubos.

- 30 Como era de esperar, hay una liberación más lenta y sostenida desde los nanotubos cargados con una cantidad mayor de proteína, comparada con las cargadas con cantidades menores de proteína. Asimismo, los datos de los resultados obtenidos exponen que la liberación de LYS desde los nanotubos es mucho más lenta en comparación con el de BSA. Se opina que esto es debido a la diferencia que existe entre las proteínas cargadas negativa y positivamente que interaccionan con la carga superficial de la interfase de los nanotubos. Las superficies de la mayor parte de películas de óxidos metálicos están cargadas intrínsecamente como consecuencia de la equilibración de defectos de enrejados cristalinos cargados de dentro de la superficie. Dependiendo de la concentración neta de defectos de enrejado, la superficie puede cargarse negativa o positivamente. La superficie de los nanotubos de titania consiste en grupos hidroxilados terminales que dan por resultado carga negativa suave sobre la superficie. Por tanto, el hecho de que la liberación de LYS, que está cargada positivamente, sea mucho más lenta comparada con la de BSA que está cargada negativamente, puede deberse a una interacción electrostática más fuerte entre la LYS y la superficie de titania.

Tabla 4

	Albúmina de suero bovino	Lisozima
200 $\mu\text{g}$	25	36
400 $\mu\text{g}$	50	85
800 $\mu\text{g}$	65	110

Este estudio expone que pueden fabricarse fácilmente nanotubos de titanio con un proceso de anodización y que estos nanotubos pueden cargarse también, opcionalmente, con fármacos o agentes biológicos tales como proteínas. Además, la liberación o elución de los fármacos o agentes biológicos que proceden de los nanotubos, pueden regularse variando la longitud del tubo, el diámetro y el grosor de la pared de los mismos. En esta memoria, se ha puesto de manifiesto que pueden regularse las velocidades de liberación de BSA y LYS variando sus cargas en los propios nanotubos, las cantidades cargadas en nanotubos. Además, cambiando el diámetro de los nanotubos, el grosor de la pared y la longitud de los mismos, las características cinéticas de liberación pueden alterarse para fármacos específicos con objeto de conseguir una liberación sostenida del fármaco a lo largo de un período de tiempo. Por tanto, estas superficies nanotubulares tienen aplicaciones potenciales en ortopedia, específicamente para implantes en que se desea una oseointegración más rápida junto con una liberación controlada de fármacos tales como antibióticos o factores de crecimiento.

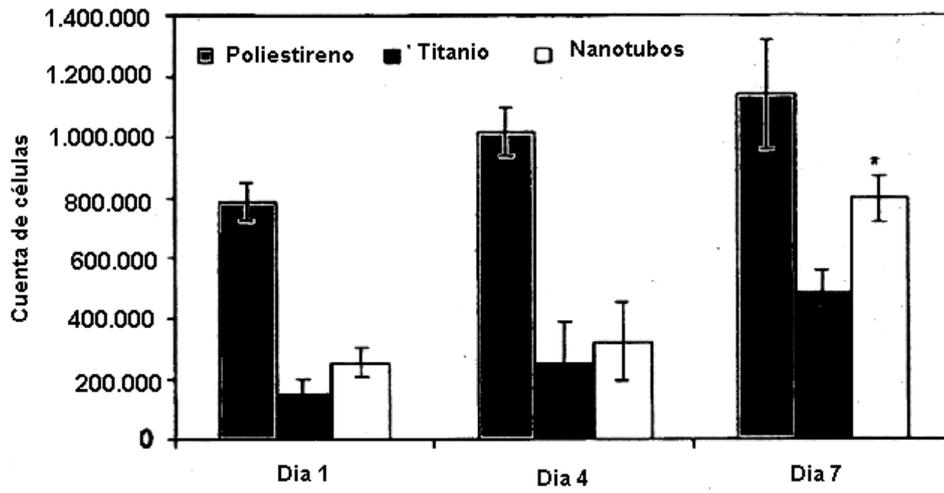
**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un implante médico que comprende una superficie o película que comprende una pluralidad de nanotubos que tienen diámetros de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 300 nm y en una densidad mayor que 10.000.000 de nanotubos por centímetro cuadrado, donde dichos nanotubos comprenden un agente bioactivo de elución al tejido circundante por colocación en un sujeto, y en donde dicha pluralidad de nanotubos comprende además una película de cierre que se erosiona proporcionando una elución retardada del agente bioactivo.
- 2.- El implante médico según la reivindicación 1, en donde dicho implante médico es un implante gastrointestinal.
- 3.- El implante médico según la realización 1 ó la reivindicación 2, en donde el dispositivo médico proporciona la distribución localizada de dicho agente activo a un tracto gastrointestinal.
- 4.- El implante médico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha superficie o película está comprendida por poli(DL-lactida-co-glicolida) (PLGA), poli(DL-lactida-co-ε-caprolactona) (DLPLCL), poli(ε-caprolactona) (PCL), cológeno, gelatina, agarosa, poli(metacrilato de metilo), galatín/ε-caprolactona, colágeno-GAG, colágeno, fibrina, PLA, PGA, copolímeros de PLA-PGA, poli(anhídridos), poli(hidroxi ácidos), poli(orto ésteres), poli(fumeratos de propilo) poli(caprolactonas) poli(hidroxivalerato), poliamidas, poliaminoácidos, poliacetales, policianoacrilatos biodegradables, poliuretanos y polisacáridos biodegradables, polipirrol, polianilinas, politiofeno, poliestireno, poliésteres, poliuretanos no biodegradables, poliureas, poli(acetato de vinilo etileno), polipropileno, polimetacrilato, polietileno, policarbonatos, poli(óxido de etileno), copolímeros de los anteriores, mezcla de los anteriores, y aductos de los anteriores, o combinaciones de los mismos.
- 5.- El implante médico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho agente bioactivo se selecciona de un polipéptido, un factor de crecimiento, un agente esteroide, una terapia con anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un DNA, un RNA y siRNA, un agente antimicrobiano, un antibiótico, un fármaco antirretroviral, un compuesto antiinflamatorio, un agente antitumoral, un agente antiangiogénico, y un agente quimioterápico.
- 6.- El implante médico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha superficie o película comprende un polipéptido enlazado covalentemente.
- 7.- El implante médico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dichos nanotubos varían en longitud de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 500 μm.
- 8.- El implante médico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dichos nanotubos tienen un diámetro de poro que varía de aproximadamente 3 nm a aproximadamente 250 nm.
- 9.- El implante médico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha superficie o película varía en grosor de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 2,5 mm...

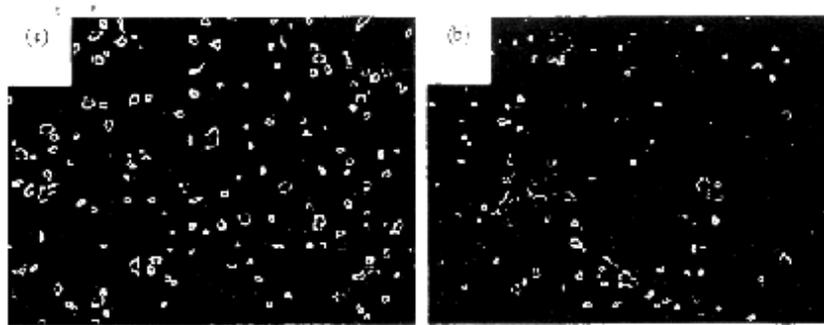


FIG. 1

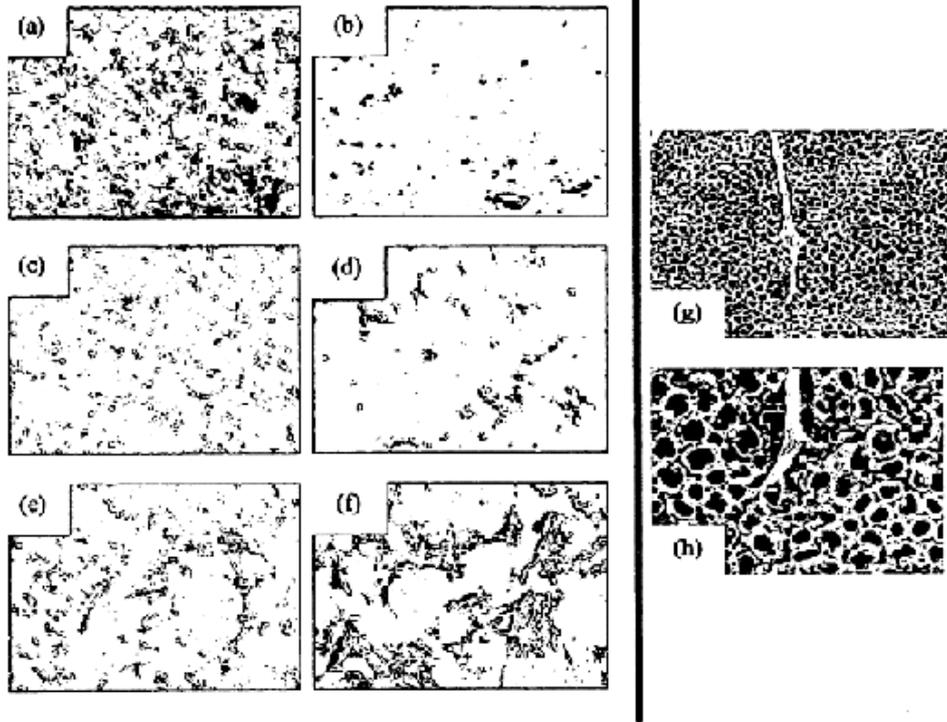
**A.**



**FIG. 2**

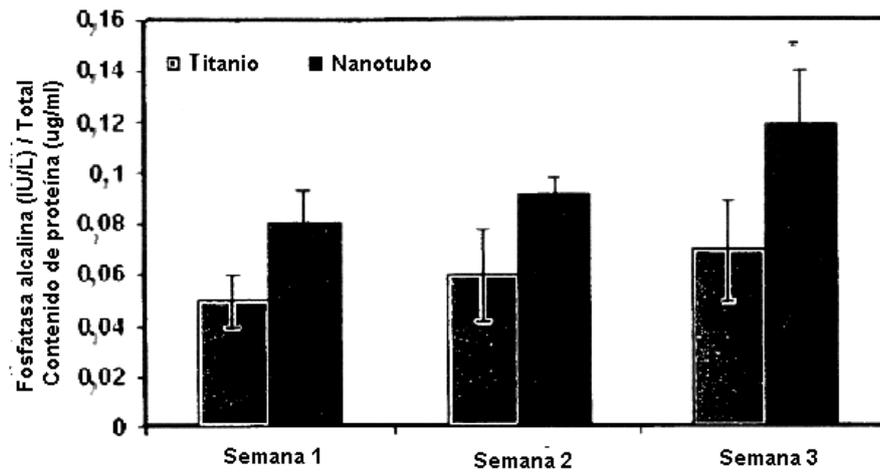


**FIG. 3**



**FIG. 4**

A.



B.

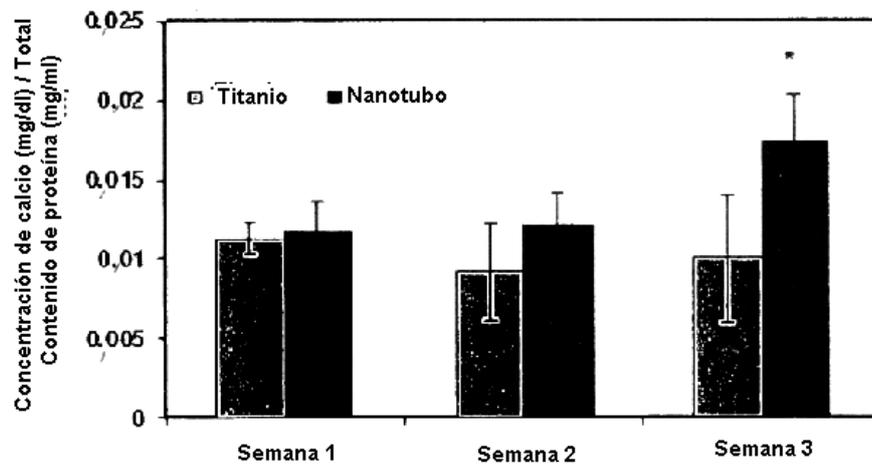


FIG. 5

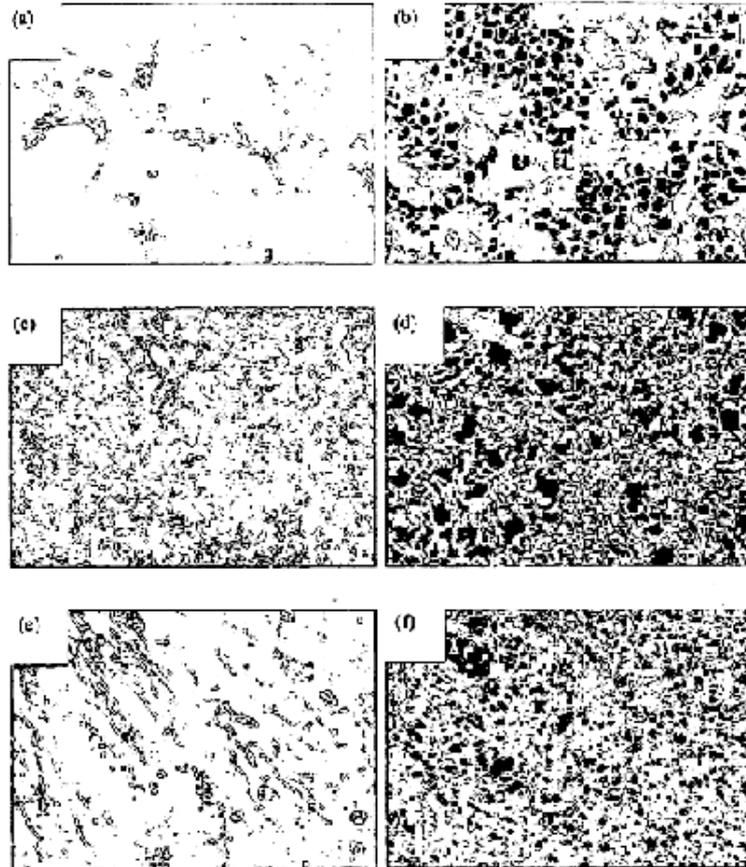


FIG. 6

779

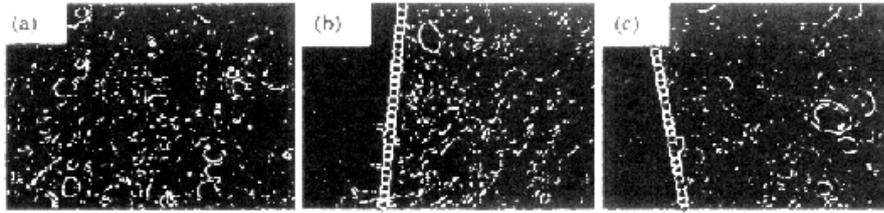


FIG. 7

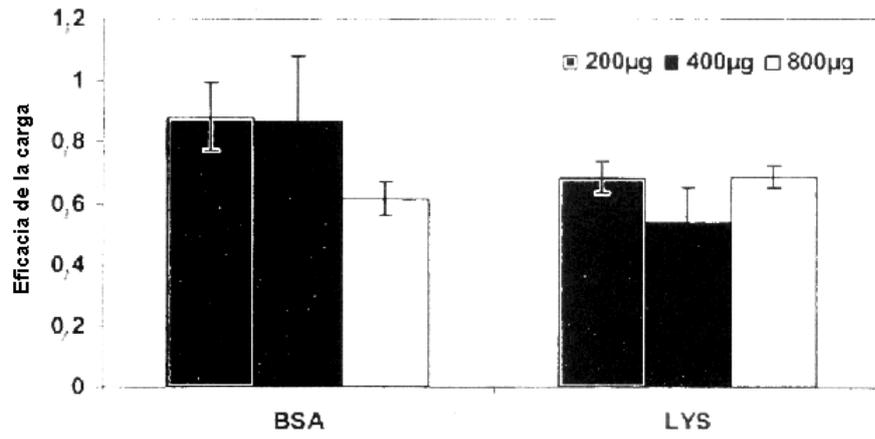


FIG. 8

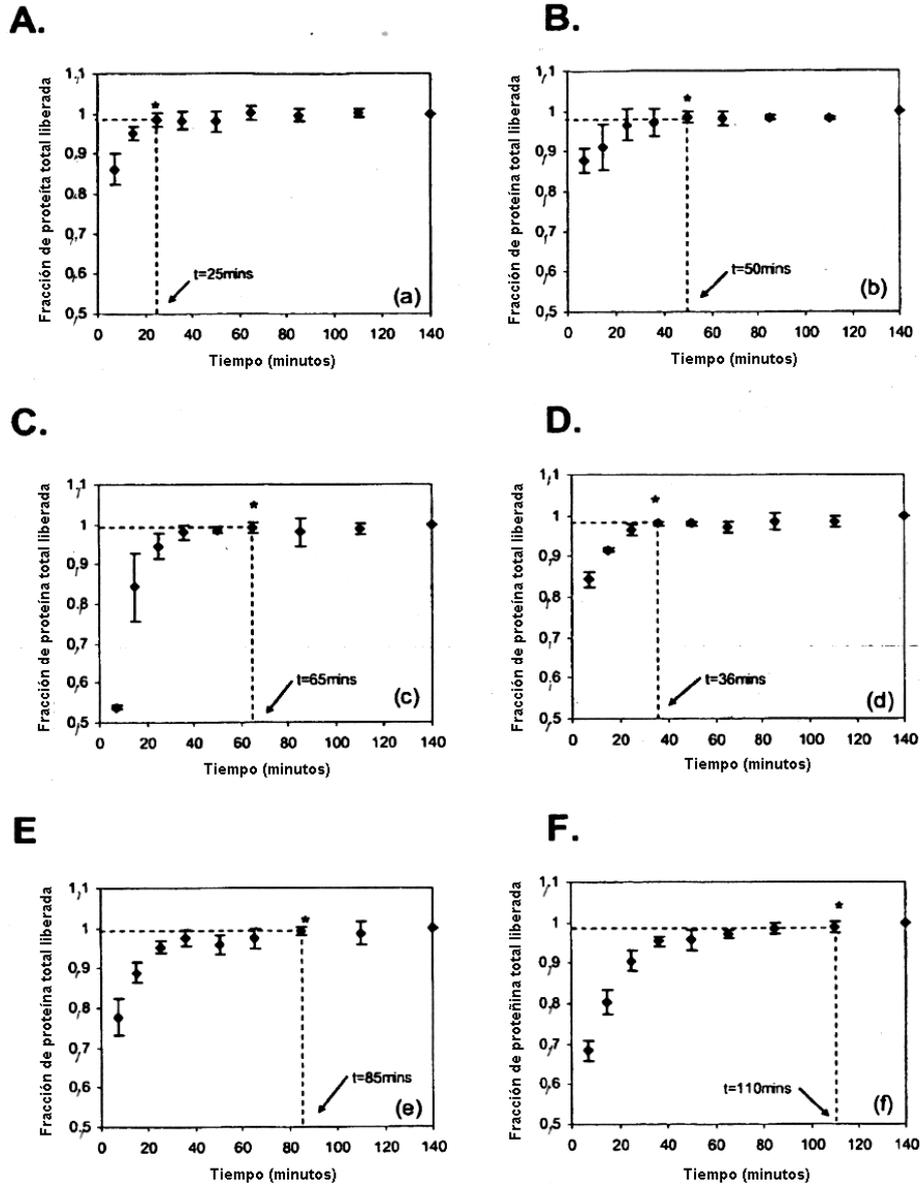


FIG. 9