

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 168**

51 Int. Cl.:

A61F 2/30 (2006.01)

A61C 8/00 (2006.01)

A61L 27/10 (2006.01)

A61L 27/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2008 E 08785974 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2178467**

54 Título: **Un implante de tejido óseo que contiene iones de litio y su método de fabricación**

30 Prioridad:

09.07.2007 EP 07112079

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

11.03.2016

73 Titular/es:

DENTSPLY IH AB (100.0%)

Box 14

431 21 Mölndal, SE

72 Inventor/es:

HANSSON, STIG y

PETERSSON, INGELA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 563 168 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

Un implante de tejido óseo que contiene iones de litio y su método de fabricación

Área técnica

5 La presente invención se refiere a un implante destinado a la implantación en el tejido óseo y a un método para su fabricación. El estado anterior de la técnica más próximo es el documento U.S. 4 365 356 A, que define el preámbulo de la reivindicación 1.

Antecedentes técnicos

Hoy en día se utiliza a menudo un procedimiento de una etapa para implantar implantes ortopédicos o dentales, generalmente implantes metálicos, en el tejido óseo.

10 En el procedimiento de una etapa, una primera pieza del implante, como un aditamento dental, se coloca quirúrgicamente en el tejido óseo, y una tapa de cicatrización o una pieza secundaria del implante, como un pilar, se fija luego directamente a la primera pieza del implante después de la operación quirúrgica. Después de eso se deja cicatrizar el tejido blando alrededor de la tapa de cicatrización o la pieza secundaria del implante. Cuando se usa una tapa de cicatrización, después de unas pocas semanas o meses se quita la tapa sin ningún procedimiento

15 quirúrgico, y se fijan las piezas secundarias del implante, como un pilar y una corona provisoria, a la primera pieza del implante. El procedimiento de una etapa se describe por ejemplo en L Cooper et al: "A multicenter 12-month evaluation of single-tooth implants restored 3 weeks after 1-stage surgery", The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, Vol 16, No 2 (2001).

20 El procedimiento de dos etapas, que es otro procedimiento de implantación conocido, consiste en colocar quirúrgicamente en una primera etapa, una primera pieza del implante, como un aditamento dental, en el tejido óseo, donde luego se le permite permanecer descargada e inmóvil durante un período de cicatrización de tres meses o más para permitir que el tejido óseo crezca sobre la superficie del implante para permitir al implante fijarse bien en el tejido óseo, dejar que el corte de tejido blando que cubre el sitio del implante cicatrice sobre el implante y en una

25 segunda etapa abrir el tejido blando que cubre el implante y fijar las piezas secundarias del implante, como un pilar dental y/o un diente de restauración, a la primera pieza del implante, por ejemplo dicho aditamento, formando la estructura final del implante. Este procedimiento se describe por ejemplo por Brånemark et al: "Osseointegrated Implants in the Treatment of the Edentulous Jaw, Experience from a 10-year period" Almquist y Wiksell International, Estocolmo, Suecia.

30 Sin embargo, el hecho de que el implante no se deba cargar durante el período de cicatrización significa que las piezas secundarias del implante no se pueden fijar a la primera pieza del implante ni utilizar durante el período de cicatrización de tres meses o más. Habida cuenta del malestar asociado a esto, es deseable minimizar el período de tiempo necesario para la primera etapa mencionada antes o incluso realizar todo el procedimiento de implantación en una sola operación, es decir utilizar el procedimiento de una etapa.

35 Para algunos pacientes, se podría considerar mejor esperar al menos tres meses antes de cargar funcionalmente el implante, tanto para el procedimiento de una como de dos etapas. Sin embargo, una alternativa utilizando el procedimiento de una etapa es poner el implante en función directamente después de la implantación (carga inmediata) o en unas pocas semanas después de la implantación (carga precoz). Estos procedimientos son descritos, por ejemplo, por D M Esposito, pp 836-837, en Titanium in Medicine, Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Application, Springer-Verlag (2001).

40 Es esencial que el implante establezca una suficiente estabilidad y unión entre el implante y el tejido óseo para permitir la carga inmediata o precoz del implante dada a conocer precedentemente. Debe señalarse también que una carga inmediata o precoz del implante puede ser beneficiosa para la formación de hueso.

45 Algunos de los metales o aleaciones, como titanio, circonio, hafnio, tantalio, niobio o sus aleaciones, que se utilizan para los implantes óseos son capaces de formar una unión relativamente fuerte con el tejido óseo, una unión que puede ser tan fuerte como el tejido óseo por sí mismo, a veces incluso más fuerte. El ejemplo más notable de este tipo de material de implante metálico es el titanio y las aleaciones de titanio, cuyas propiedades en este sentido se conocen desde 1950. Esta unión entre el metal y el tejido óseo ha sido denominada "osteointegración" (Albrektsson T, Brånemark P I, Hansson H A, Lindström J, "Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man", Acta Orthop Scand, 52:155-170 (1981)).

50 Cabe señalar que en contacto con oxígeno, el titanio, circonio, hafnio, tantalio, niobio y sus aleaciones se cubren instantáneamente con una capa delgada de óxido. Esta capa de óxido nativo en implantes de titanio consiste principalmente en dióxido de titanio(IV) (TiO₂) con cantidades menores de Ti₂O₃, TiO y Ti₃O₄.

Aunque la unión entre el metal (oxidado), por ejemplo, titanio, y el tejido óseo puede ser comparativamente fuerte, es

deseable mejorar esta unión.

5 Existen hasta la fecha varios métodos para tratar implantes metálicos con el fin de obtener una mejor fijación del implante y de esa manera una mejor osteointegración. Algunos de estos implican alterar la morfología del implante, por ejemplo mediante la creación de irregularidades en la superficie del implante con el fin de aumentar la rugosidad de la superficie en comparación con una superficie sin tratar. Se cree que una mayor rugosidad de la superficie, que da una mayor área de contacto y fijación entre el implante y el tejido óseo, proporciona una mejor retención mecánica y resistencia entre el implante y el hueso. Es bien sabido en el área que se puede proporcionar una rugosidad superficial mediante, por ejemplo, pulverización de plasma, granallado o grabado con ácido.

10 Otros métodos para obtener una mejor fijación del implante al tejido óseo implican la alteración de las propiedades químicas de la superficie del implante.

15 Varios métodos implican la aplicación de una capa de material cerámico, como hidroxiapatita, a la superficie del implante, entre otras cosas para mejorar la unión del implante al hueso dado que la hidroxiapatita está relacionada químicamente con el hueso. Una desventaja de los recubrimientos que contienen hidroxiapatita es, sin embargo, que pueden ser frágiles y pueden escamarse o desprenderse de la superficie del implante, lo que a su vez conduce a un fracaso final del implante.

Otros métodos para alterar las propiedades químicas del implante implican la aplicación de flúor y/o fluoruro sobre la superficie del implante (WO 94/13334, WO 95/17217, WO 04/008983 y WO 04/008984).

20 WO 2006/004297 da a conocer un implante de metal osteoinductor, como titanio o una aleación de éste, que contiene una capa de un óxido metálico y una capa de un material bioactivo compuesto por uno o más de Li, Na, K, Rb, Cs, Fr, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, Sc, Y, Lu, Ti, Zr, Hf, Nb, Ta, Cr, Mo, W, Mn, Re, Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt, Cu, Ag, Au, Zn, Ga, In, Ti, Sn y Bi formada sobre ella. Un ejemplo de trabajo sólo se describe, sin embargo, para un implante de titanio que contiene calcio como capa de material bioactivo.

25 También cabe mencionar a WO 2002/096475 que se refiere a un implante de titanio que contiene calcio, fósforo o azufre en la capa de óxido de titanio, y a WO 2005/084577 que se refiere a un implante de titanio que contiene magnesio en la capa de óxido de titanio.

30 La publicación de la solicitud de patente francesa N° 2 216 981 da a conocer endoprótesis ortopédicas para la fijación al hueso compuesta preferentemente por cerámica de aluminio. Según una realización de la invención dada a conocer en FR 2 216 981, las partes de la superficie de la prótesis destinadas al contacto con el hueso pueden ser mezcladas con iones que estimulan la formación de una fijación sólida entre la prótesis y el tejido óseo. Se han utilizado iones de litio, boro, carbono, flúor, sodio, magnesio, silicio, fósforo, potasio y/o calcio en cerámica vítrea y cerámica de aluminio.

Aunque existen implantes que proporcionan una unión comparativamente fuerte entre la superficie del implante y el hueso, existe la necesidad en el área de mejorar esta unión, es decir, mejorar el proceso de "osteointegración" de un implante en el tejido óseo.

35 Por lo tanto, existe la necesidad en el área de proporcionar un implante que tenga una velocidad de fijación deseada y que tenga la capacidad de formar una unión mecánicamente fuerte entre el hueso y el implante luego de la implantación de éste en el tejido óseo.

Resumen de la invención

Es un objetivo de la invención satisfacer las necesidades mencionadas.

40 Por lo tanto, se va a proporcionar un implante biocompatible destinado a la implantación en el tejido óseo.

Los inventores encontraron que los iones de litio administrados localmente en el tejido óseo tienen un efecto local sobre la formación de hueso y la masa ósea en el tejido óseo.

45 Se encontró además que un implante que comprende una capa de óxido superficial que contiene o libera iones de litio induce un aumento en la producción de fosfatasa alcalina en los osteoblastos, lo que es crucial para su diferenciación y mineralización posterior. Por lo tanto, se puede lograr una mejora en la velocidad de formación de hueso y una mejora en la velocidad de fijación entre el tejido óseo y el implante, mejorando además la posibilidad de carga inmediata o precoz del implante.

50 Además, se encontró que un implante que comprende una capa de óxido superficial que contiene y/o libera iones de litio proporciona un aumento de la proliferación de osteoblastos y un aumento en la producción de osteoprotegerina, en comparación con un implante metálico que comprende una capa de óxido superficial que contiene, por ejemplo, iones de calcio o magnesio. Se proporciona por tanto una mayor masa ósea lo que implica una unión

mecánicamente más fuerte entre el implante y el tejido óseo.

Concordantemente, se encontró que los iones de litio administrados localmente mejoran el proceso de osteointegración de un implante en el tejido óseo.

5 Según un primer aspecto de la invención, se logran los objetivos anteriores con un implante destinado a la implantación en el tejido óseo como el definido en la reivindicación 1.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para fabricar un implante de tejido óseo con las características mencionadas antes. El método se define en la reivindicación 8.

El método de la invención es económico y fácil de llevar a cabo, permitiendo por consiguiente la producción en masa. Además, es fácil de esterilizar y almacenar.

10 Otras características y ventajas de la presente invención se tornarán evidentes a partir de la descripción siguiente de la invención.

Breve descripción de las figuras

15 Fig. 1 es una imagen de TOF-SIMS (masas de iones secundarios por tiempo de vuelo) que ilustra la presencia y la distribución de litio para una muestra de titanio esterilizada luego de la reducción en LiNO_3 . (El litio se muestra como puntos blancos).

Fig. 2 ilustra la presencia de litio, (pico N° 7) en una muestra de titanio esterilizada (fig. 2a) en comparación con la muestra de referencia de una muestra de titanio esterilizada tratada con ácido oxálico (fig. 2b) (a partir de mediciones TOF-SIMS).

20 Fig. 3 es una imagen de TOF-SIMS que ilustra la presencia y la distribución de litio para una muestra de titanio esterilizada luego del anodizado en LiOH .

Fig. 4 ilustra el grado de proliferación de células MG-63 luego de 3, 7 y 14 días de cultivo en poliestireno de células tratadas con o sin litio en diferentes concentraciones.

25 Fig. 5 ilustra la producción de fosfatasa alcalina en el medio de cultivo celular luego de 3, 7 y 14 días de cultivo en poliestireno de células tratadas con y sin litio en diferentes concentraciones.

Fig. 6 muestra el grado de proliferación de las células MG-63 en las superficies de referencia 1 y 2 luego de 7 días de cultivo con y sin litio en diferentes concentraciones.

Fig. 7 muestra la producción de fosfatasa alcalina en la superficie de referencia 1 que contiene litio a una concentración de 1 mM en comparación con la superficie sin estimular que no contiene litio.

30 Fig. 8 es una imagen de microscopía electrónica de barrido que ilustra la morfología de las células MG-63 cultivadas en la superficie de referencia 1 luego de 36 h.

Fig. 9 es una imagen de microscopía electrónica de barrido que ilustra la morfología de células MG-63 cultivadas en la superficie de referencia 2 luego de 36 h.

35 Fig. 10 es una imagen de microscopía electrónica de barrido que ilustra la morfología de células MG-63 cultivadas en la superficie de referencia 1 que contiene litio luego de 36 h.

Fig. 11 ilustra las diferencias en la proliferación de células MG-63 entre la superficie de referencia 1, la superficie de referencia 2 y la superficie de referencia 1 que contiene litio, calcio y magnesio, respectivamente.

40 Fig. 12 muestra la cantidad de osteoprotegerina medida luego de 7 y 14 días de cultivo celular en la superficie de referencia 1 que contiene litio, calcio y magnesio, respectivamente.

Fig. 13 ilustra los valores de la prueba de torque de remoción (RTQ) después de 6 semanas de la implantación en tibia de conejo de un implante que contiene litio según la invención, en comparación con un implante con una superficie Osseospeed™ comercial.

Descripción detallada de la invención

45 Según se usa en este documento el término "implante" incluye dentro de su alcance cualquier dispositivo destinado a ser implantado en el cuerpo de un animal vertebrado, en particular un mamífero, como un ser humano. Los

implantes se pueden utilizar para reemplazar la anatomía y/o restaurar alguna función del cuerpo.

Generalmente, un implante se compone de una o varias piezas de implante. Por ejemplo, un implante dental habitualmente comprende un aditamento dental acoplado a piezas de implante secundarias como un pilar y/o un diente de restauración. Sin embargo, cualquier dispositivo, como un aditamento dental, destinado a la implantación puede denominarse sólo él un implante aún si tiene otras piezas conectadas al mismo.

Según se usa en este documento la expresión "implante (destinado) a la implantación en el tejido óseo" se refiere a los implantes destinados al menos a la implantación parcial en el tejido óseo, como los implantes dentales, por ejemplo implantes de una pieza, implantes ortopédicos y similares. Un implante para la implantación en el tejido óseo también puede ser denominado un implante de tejido óseo.

Según se usa en este documento la expresión "superficie del implante" se refiere al menos a una región superficial definida de un implante. Por lo tanto, la región superficial definida puede incluir toda el área superficial del implante o porciones de éste.

Un ejemplo de una superficie de un implante destinado a la implantación en el tejido óseo es la superficie de un aditamento dental destinado a la implantación en el maxilar de un paciente y a estar en contacto con tejido óseo.

Otro ejemplo de una superficie de un implante destinado a la implantación en el tejido óseo es la superficie de un implante de cadera destinado a la implantación en el fémur de un paciente.

Un implante según la invención es biocompatible y tiene un efecto local sobre la formación de hueso y la masa ósea en el tejido óseo. Además, el implante de la invención provoca un aumento de la proliferación de osteoblastos y un aumento en la producción de fosfatasa alcalina y osteoprotegerina en el tejido óseo. La fosfatasa alcalina es una enzima producida por los osteoblastos que juega un papel importante en la mineralización del hueso, y la osteoprotegerina es una citocina que se sabe que aumenta la densidad mineral ósea y el volumen óseo en el tejido óseo. La producción de fosfatasa alcalina y osteoprotegerina indica claramente que el implante según la invención tiene un efecto positivo sobre la remodelación ósea.

Un implante según la invención proporciona mejores estabilidad del implante y respuesta del tejido óseo, según se miden por la prueba de torque de remoción (RTQ) (fig 13).

La capa de óxido que cubre la superficie del implante contiene iones de litio que están dispersos en al menos una parte de la capa de óxido.

El litio es un ion pequeño, cargado positivamente, no tóxico, liviano que se ha encontrado que se dispersa fácilmente en la capa de óxido que cubre la superficie del implante.

Aunque se conoce un efecto terapéutico de las sales de litio para trastornos maniaco-depresivos, los estudios han demostrado que el tratamiento con litio también afecta el metabolismo mineral óseo (por ejemplo, Baran et al, "Lithium Inhibition of Bone Mineralization and Osteoid Formation", J Clin Invest, pp 1691-1696 (1978); Nordenstrom et al, "Biochemical Hyperparathyroidism and Bone Mineral Status in Patients Treated Long-Term with Lithium", Metabolism, vol 43, N° 12, pp 1563-1567 (1994); y Mak et al, "Effects of Lithium Therapy on Bone Mineral Metabolism: A Two-Year Prospective Longitudinal Study", J Clin Endocrin and Metabol, vol 83, N° 11, pp 3857-3859 (1998)).

Recientemente, se ha sugerido la administración oral de cloruro de litio para el tratamiento de trastornos de baja masa ósea, como la osteoporosis, puesto que se concluyó que el litio aumenta la formación de hueso y mejora la masa ósea mediante la activación de la vía Wnt canónica lo que resulta, por ejemplo, en la estimulación de la replicación de los pre osteoblastos, la inducción de osteoblastogénesis y la inhibición de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (Clément-Lacroix et al, "Lrp5-independent Activation of Wnt Signalling by Lithium Chloride Increases Bone Formation and Bone Mass in Mice", PNAS, vol 102, N° 48, pp 17406-17411 (2005) y Krishnan et al, "Regulation of Bone Mass by Wnt Signaling", J Clin Invest, vol 116, N° 5, pp 1202-1209 (2006).

Las vías de señalización Wnt son un objetivo atractivo para el tratamiento de la osteoporosis y en general para el descubrimiento de fármacos anabólicos óseos (Rawadi G et al, "Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis", Expert Opin. Ther. Targets, Vol 9, pp 1063-1077 (2005))). El hecho de que el litio active la vía Wnt hace a la presente invención muy adecuada para la implantación en el tejido óseo.

Además, el hecho de que el litio haya sido utilizado previamente para el tratamiento de los trastornos maníaco-depresivos implica que la descripción toxicológica y los efectos secundarios por la administración sistémica son bien conocidos.

Además, el litio tiene una química relativamente simple y generalmente es indestructible y no es afectado por ejemplo por la esterilización.

- La incorporación de iones de litio en la capa de óxido puede alterar la estructura del óxido volviéndolo más reactivo. Cuando se incorporan iones de litio cargados positivamente a la capa de óxido, se proporciona una mayor densidad de carga superficial positiva en la superficie del óxido (superficie del implante). Por lo tanto, las proteínas ricas en electrones del tejido óseo pueden ser eléctricamente atraídas a la superficie. Los iones incorporados también pueden afectar la conductividad del óxido que puede tener un efecto positivo sobre la osteointegración y la hemocompatibilidad.
- Al menos una parte de la capa de óxido debe contener iones de litio, y el efecto osteoconductor deseado del litio en un implante de la invención se puede lograr mediante la presencia de los iones en la capa de óxido. No obstante, también se puede lograr mediante la liberación de iones de litio desde la capa de óxido al líquido fisiológico que rodea al implante.
- Preferentemente, los iones de litio están homogéneamente distribuidos en la capa de óxido. Dicha distribución homogénea se ilustra en la figura 1.
- El implante según la presente invención es adecuadamente un implante metálico, por ejemplo un implante hecho de titanio o una aleación de titanio.
- Sin embargo en realizaciones, el implante puede ser un implante no metálico que contenga por ejemplo un material cerámico, plástico o compuesto. En dichas realizaciones, la superficie del implante es una capa metálica del implante aplicada sobre el implante no metálico, mediante lo cual se proporciona una superficie del implante parcialmente metálica. La capa metálica del implante contiene preferentemente titanio o una aleación de titanio.
- Sin embargo, el implante metálico, y la capa metálica del implante no están limitados a un metal específico, sino que se pueden hacer de cualquier material metálico biocompatible, como circonio o una aleación del mismo, hafnio o una aleación del mismo, niobio o una aleación del mismo, tantalio o una aleación del mismo, una aleación de cromo-vanadio, o cualquier combinación de estos materiales.
- La capa de óxido que cubre la superficie del implante tiene un espesor del orden de 2 a 100 nm.
- En contacto con oxígeno, el titanio, circonio, hafnio, tantalio, niobio y sus aleaciones se cubren instantáneamente con una capa delgada de óxido. Esta capa de óxido nativo en los implantes de titanio consiste principalmente en dióxido de titani(IV) (TiO_2) con cantidades menores de Ti_2O_3 , TiO y Ti_3O_4 .
- En realizaciones preferidas, la capa de óxido es una capa de óxido que se forma espontáneamente, por ejemplo, en contacto con el aire. El espesor de una capa de óxido formada espontáneamente es del orden de 2 a 18 nm, por ejemplo del orden de 2 a 6 nm.
- La capa de óxido según la invención no aumenta sustancialmente de espesor con el tiempo y protege la superficie metálica subyacente de reaccionar con cualquier agente circundante.
- Las superficies de implantes metálicas cubiertas por capas de óxido son conocidas en el área. Sin embargo, varios documentos del estado anterior de la técnica hacen hincapié en la importancia de proporcionar una capa de óxido gruesa, preferentemente por encima de 600 nm sobre la superficie del implante (Sul et al, "Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides", Clin. Oral. Impl. Res., Vol 13, pp 252-259 (2002); Sul et al, "Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodized implants", Biomaterials, Vol 23, N° 8, pp 1809-1817 (2002)). Dichos implantes requieren un paso adicional de oxidación dado que las capas de óxido del espesor mencionado antes no se pueden obtener espontáneamente.
- Los inventores de la presente encontraron que una capa de óxido con un espesor de menos de 100 nm, preferentemente una capa de óxido con el espesor de una capa de óxido nativa, es decir, una capa de óxido formada espontáneamente, de menos de 18 nm es más adecuada para la implantación en el tejido óseo puesto que las capas gruesas de óxido pueden ser muy frágiles. Además, las capas gruesas de óxido pueden agrietarse y descascararse durante períodos de implantación más prolongados de un implante en el tejido óseo.
- Este hallazgo se contrapone a Xiropaidis et al quienes manifiestan que los implantes de titanio con capas de óxido nativas se consideran menos osteoconductores. (Xiropaidis et al, "Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite™)-modified oral implants", Clin. Oral. Impl. Res, N° 16, pp 532-539 (2005)).
- Una capa de óxido según la invención no interfiere ni modifica la topografía de la superficie del implante. Por otra parte, un implante que contiene una capa de óxido con un espesor de menos de 100 nm, por ejemplo, de menos de 18 nm, por ejemplo, entre 2 y 6 nm es biocompatible, lo que es adecuado para su incorporación en el cuerpo humano.
- Por lo tanto, una capa de óxido que contiene iones de litio según la invención es adecuada para cualquier geometría o cualquier sustrato.

La superficie del implante, del implante según la invención, es preferentemente una superficie del implante metálica que contiene una capa de óxido metálico sobre su superficie.

En particular, el implante, en particular la superficie del implante según la invención contiene titanio o una de sus aleaciones. Dicha superficie del implante está cubierta por lo tanto por una capa de óxido de titanio.

- 5 Concomitantemente, en un implante de la presente invención, la capa de óxido que cubre la superficie del implante es una capa de óxido metálico formada sobre la superficie metálica del implante.

10 En realizaciones, el implante según la invención se puede proporcionar además con un depósito por encima de la capa de óxido. Dicho depósito puede comprender un agente estimulante óseo, como litio, estroncio, calcio, magnesio o cualquier otro ion que tenga un efecto estimulante óseo. Habitualmente, el depósito contiene iones de litio.

Según se usa en este documento el término "depósito" se refiere a una película continua o discontinua provista sobre la capa de óxido. Dicho depósito puede tener cualquier espesor y no está incorporado en la capa de óxido, sino que se proporciona sobre ella.

15 Habitualmente, el depósito es una precipitación de sal que contiene uno o una combinación de iones elegidos entre litio, estroncio, magnesio y calcio.

Habitualmente, el depósito es una precipitación de sal de litio, es decir, una sal de litio que se precipita sobre la capa de óxido de la superficie del implante.

20 Los ejemplos de sales de litio adecuadas son hidróxido de litio, fluoruro de litio, cloruro de litio, sulfato de litio, nitrato de litio, carbonato de litio. Sin embargo, se puede utilizar cualquier sal de litio capaz de ser disuelta al menos parcialmente en el líquido fisiológico que rodea el implante. Dichas sales son conocidas por los expertos en el área.

Luego de la implantación, un depósito que contiene una precipitación de sal se disuelve fácil y rápidamente en el líquido circundante de modo que los iones estimulantes óseos son liberados desde el implante. Un implante provisto con un depósito de ese tipo sobre su superficie puede ser particularmente beneficioso en situaciones en las que un implante necesita integrarse más rápidamente, por ej. en hueso de mala calidad y poca cantidad.

25 Una ventaja asociada a un implante que contiene un depósito del tipo mencionado antes en su superficie es que los iones estimulantes óseos, por ejemplo los iones de litio, son liberados fácil y eficazmente en el líquido fisiológico que rodea el implante. Por lo tanto, se puede liberar una dosis mayor de iones estimulantes óseos, por ejemplo iones de litio, en el líquido circundante.

30 Por consiguiente, el efecto deseado del litio se puede obtener tanto de los iones presentes en el óxido de la capa de óxido que está sobre la superficie del implante como de los iones liberados de ella.

Un implante según la presente invención carece convenientemente de un recubrimiento que contenga un compuesto de fosfato de calcio. Como se señaló en la introducción, estos implantes son más propensos a escamarse o desprenderse de la superficie del implante, lo que puede conducir a un fracaso final del implante.

35 En realizaciones de la invención, la superficie del implante puede comprender además una micro rugosidad con una rugosidad media cuadrática (R_q y/o S_q) de ≤ 250 nm (es decir, una micro rugosidad compuesta por poros con un diámetro de poro de ≤ 1 μ m y una profundidad de poro de ≤ 500 nm) en al menos una parte de la superficie del implante. Según se usa en este documento la expresión "nano rugosidad o micro rugosidad" se refiere a una rugosidad de la superficie que consta de irregularidades superficiales que tienen dimensiones inferiores a 1 μ m.

40 Tal rugosidad de la superficie es probable que provea de una zona de contacto y fijación mayor entre el implante y el tejido óseo y proporcione mejores retención mecánica y resistencia entre el implante y el hueso. En realizaciones alternativas, la superficie del implante se compone de flúor y/o fluoruro, por ejemplo 0.2-20%, y opcionalmente también una micro rugosidad con una rugosidad media cuadrática (R_q y/o S_q) de ≤ 250 nm, en al menos una parte de la superficie del implante.

45 Opcionalmente, la superficie del implante según la invención puede contener una macro rugosidad. Según se usa en este documento la expresión "macro rugosidad" se refiere a una rugosidad de la superficie que comprende irregularidades superficiales que tienen dimensiones superiores a 1 μ m.

También se debe hacer constar que la superficie del implante puede ser roscada o sin roscar o se le pueden dar otras características topográficas dependientes del uso.

50 Además, la presente invención se refiere a un método para fabricar un implante de tejido óseo con las características descritas antes, que comprende los pasos de:

- a) proporcionar un implante dotado de una superficie de implante;
- b) formar una capa de óxido que recubra dicha superficie del implante;
- c) formar iones cargados negativamente sobre dicha capa de óxido; y
- d) poner en contacto dicha capa de óxido con iones de litio.

5 Como se mencionó previamente, el implante es un implante metálico, o es un implante no metálico provisto de una superficie metálica. Cuando se utilizan implantes no metálicos en la presente invención, se puede proporcionar una superficie metálica del implante por cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en el área. Por ejemplo, se puede usar cualquier tratamiento electroquímico adecuado.

10 Una capa de óxido que cubre la superficie del implante se forma preferentemente espontáneamente, por ejemplo, en contacto con el aire. Dicha capa es pasiva e inerte, es decir, es estable y evita que la superficie metálica subyacente reaccione posteriormente.

15 Sin embargo, es posible utilizar cualquiera de las técnicas de oxidación convencionales en el método citado precedentemente. Por lo tanto, el método no se limita a la formación espontánea de una capa de óxido. Por ejemplo, se puede formar una capa de óxido sobre una superficie metálica del implante mediante oxidación anódica del implante en un electrolito, como una solución acuosa de un ácido orgánico. También se puede formar una capa de óxido sobre una superficie metálica del implante mediante calentamiento en el aire, por ejemplo, a 150-1300 °C. Además, se puede formar una capa de óxido sobre una superficie metálica del implante mediante precipitación del óxido sobre la superficie del implante desde una solución adecuada.

20 Como ya se mencionó, una capa de óxido que cubra dicha superficie del implante se forma preferentemente espontáneamente, lo que es una ventaja ya que no es realmente necesario ningún paso adicional de oxidación.

Por referencia al paso c) en el método descrito antes, se pueden formar iones cargados negativamente en dicha capa de óxido sometiendo la superficie del implante a un ambiente alcalino.

25 En contacto con una solución acuosa el óxido metálico de la superficie, por ejemplo óxido de titanio, alterará la estructura de la molécula de agua de sus inmediaciones, y, dependiendo del pH, se volverá ya sea positiva o negativamente cargada. Cuando la superficie no está cargada y no hay iones adsorbidos sobre la superficie, el pH se denomina punto de carga cero pH_{pzc} . El pH_{pzc} para el óxido de titanio es de 5-7.

30 Por lo tanto, cuando la superficie de óxido de titanio está rodeada por un ambiente acuoso y alcalino, por ejemplo, una solución alcalina con un pH superior a 7, la superficie se vuelve ligeramente cargada negativamente debido a la formación de grupos hidróxido cargados negativamente unidos a la superficie. Los iones de litio cargados positivamente que pueden estar presentes en una solución circundante pueden ser por lo tanto atraídos eléctricamente a la superficie del óxido (superficie del implante) y de esa manera quedar incorporados en al menos parte de la capa de óxido, habitualmente la parte superior de la capa de óxido. Preferentemente, los iones de litio se distribuyen homogéneamente en la capa de óxido.

35 Se puede lograr un ambiente alcalino localmente sobre la superficie del óxido; es decir se pueden formar iones cargados negativamente sobre la capa de óxido aplicando un potencial que sea más negativo que -0.5 V; habitualmente en el intervalo entre -0.5 y -3.5 V. La aplicación de un potencial de ese tipo aumentará la alteración de las moléculas de agua, generando la formación de gas de hidrógeno y grupos hidróxido cargados negativamente unidos a la superficie, sobre la superficie del implante.

40 Alternativamente, se logra un ambiente alcalino sometiendo la superficie del implante a una solución alcalina, por ejemplo, remojando la superficie del implante en una solución alcalina. Dicha solución alcalina debe tener un pH superior a 7, por ej. superior a 10; y habitualmente superior a 11. El tiempo de remojo puede ser menos de 30 minutos, por ejemplo, menos de 20 minutos, por lo general entre 10 y 15 minutos.

45 Luego la superficie del implante se pone en contacto con iones de litio cargados positivamente; por ejemplo, sometiendo la superficie del implante a una solución compuesta por iones de litio. El paso de poner dicha capa de óxido en contacto con iones de litio se puede realizar simultáneamente con, o luego, del paso de formar iones negativamente cargados sobre dicha capa de óxido. Preferentemente los pasos c) y d) del método según la invención se realizan simultáneamente.

50 Por ejemplo, aplicando un potencial dentro del intervalo de -0,5 V a -3.5 V en una solución que contiene litio, se formarán grupos hidróxido cargados negativamente, lo que conduce a una interacción electrostática entre los grupos hidróxido unidos a la superficie y los iones de litio presentes en la solución. Esta interacción electrostática resulta en que los iones de litio se incorporan en la capa de óxido. Esto se describe adicionalmente en el ejemplo 1.

La solución que contiene iones de litio puede ser una solución que contenga hidróxido de litio en una concentración

de 5.3 M o menos. La concentración de hidróxido de litio no debe exceder de 5.3 M, lo que representa el producto de solubilidad del hidróxido de litio. Cuando la concentración de LiOH exceda de 5.3 M, se formarán cristales de sal y precipitarán sobre la superficie del óxido. En el paso c) del método según la invención, es deseable que los iones se incorporen en el óxido, y por lo tanto, la concentración de LiOH no debe exceder el producto de solubilidad.

5 Una concentración preferida del hidróxido de litio es dentro del intervalo de 0.05 a 2 M.

Los pasos de formar iones cargados negativamente sobre la superficie del óxido y poner dicha capa de óxido en contacto con los iones de litio, incorporando así los iones de litio en la capa de óxido que cubre la superficie del implante, no se limitan a un método específico sino que se pueden lograr mediante cualquier método adecuado, o cualquier combinación de métodos. Por ejemplo, la superficie del implante se puede anodizar en una solución alcalina compuesta de iones de litio. El ejemplo 1 ilustra la incorporación de iones de litio mediante anodizado en hidróxido de litio.

10

Sometiendo la superficie del implante a un paso de anodización, el espesor de la capa de óxido se verá afectado. Sin embargo, como el anodizado se realiza preferentemente con una velocidad de barrido relativamente baja, por ejemplo, por debajo de 6 mV/s hasta llegar a 8 V, el espesor del óxido no aumentará a más de 100 nm.

15 Por lo tanto, los iones de litio se incorporan en la capa de óxido por medio de la interacción electrostática entre grupos hidróxido cargados negativamente formados sobre la superficie del implante y los iones de litio cargados positivamente presentes en una solución circundante.

Opcionalmente, el método según la invención puede comprender el paso de enjuague y/o limpieza de dicha superficie del implante después del paso d). Además, la superficie del implante se puede secar y esterilizar luego de dicho paso de enjuague.

20

En realizaciones, el método según la invención comprende además el paso de formación de un depósito compuesto por un agente estimulante óseo como litio, estroncio, calcio y magnesio por encima de la capa de dicho óxido, por ejemplo, precipitando una sal que contenga los iones mencionados antes sobre la superficie del implante; es decir sobre la capa de óxido que cubre dicha superficie.

25 La sal puede ser cualquier sal adecuada de los iones mencionados antes que sea al menos parcialmente soluble en el líquido fisiológico que rodea el implante. La precipitación de una sal sobre la superficie del implante formará una película continua o discontinua sobre la superficie. El espesor del depósito dependerá de la cantidad de sal precipitada.

Una sal de ese tipo se disuelve fácil y rápidamente en contacto con el líquido fisiológico que rodea el implante de modo que el efecto estimulante óseo deseado se logra mediante la liberación de iones estimulantes óseos desde la superficie del implante.

30

Cuando el depósito es una precipitación de una sal de litio, el paso de formación de dichos depósitos se puede lograr mediante la modificación de los métodos descritos antes para la formación de iones cargados negativamente sobre la superficie de la capa de óxido. Por ejemplo, se puede aplicar un potencial más negativo que -3.5 V. Dicho potencial negativo da lugar a un desarrollo de gas de hidrógeno significativamente aumentado y una mayor alteración de las moléculas de agua. Por lo tanto, se forma un exceso de grupos hidróxido unidos a la superficie cargados negativamente que resulta en un depósito, es decir un precipitado de hidróxido de litio por encima de la capa de óxido. Véase el ejemplo 2 por una descripción adicional.

35

Además, sometiendo la superficie del implante a una solución compuesta por hidróxido de litio en una concentración por encima del producto de solubilidad de 5.3 M, se formará un depósito de sal de litio en la superficie del óxido (superficie del implante). Esto también se debe al exceso de grupos hidróxido en los alrededores.

40

Sin embargo, el paso de formación de un depósito por ejemplo de una sal de litio no se limita a ningún método específico, sino que se puede utilizar cualquier método. Tampoco se limita a una sal de litio específica, sino que se puede usar cualquier sal que sea al menos parcialmente soluble en el líquido fisiológico que rodea a un implante.

45 Además, se puede utilizar cualquier método para provocar una precipitación de sal que contenga cualquiera o una combinación de los iones elegidos entre litio, estroncio, magnesio y calcio, por ejemplo, la solución que contiene litio también puede contener cualquiera o una combinación de los iones mencionados precedentemente. En tales casos, una pequeña cantidad de esos iones también se puede incorporar en la capa de óxido.

El paso de formar un depósito también se puede realizar mediante una combinación de los métodos mencionados antes.

50

Se debe observar sin embargo que también se pueden usar en la presente invención métodos conocidos para la incorporación de iones y formación de depósito sobre la superficie de un implante. Dichos métodos incluyen por

ejemplo:

- depósito de plasma, por ejemplo mediante fuente de plasma-implantación iónica o implantación iónica por inmersión en plasma sobre metales,
- cualquier tratamiento electroquímico, por ejemplo voltametría en un electrolito compuesto por iones de litio,
- 5 • tratamiento del implante con una solución acuosa o no acuosa compuesta por iones de litio, por ejemplo sumergiendo dicho implante en dicha solución,
- tratamiento del implante con una técnica de sol-gel,
- implantación de haz de iones,
- arco en vacío,
- 10 • arco en vacío filtrado,
- arco en vacío de vapor metálico,
- depósito de iones,
- depósito de vapores químicos,
- depósito de vapor químico asistido por plasma,
- 15 • pulverización,
- ablación con láser
- proporcionar un recubrimiento, como un recubrimiento que contenga fosfato de calcio o un recubrimiento de silano, sobre la superficie del implante, en la cual se pueden incorporar o a la cual se puedan fijar los iones de litio,
- 20 cualquier combinación de estos métodos o similares. El método según la invención puede comprender además el paso de creación de una micro rugosidad en la superficie del implante.

Antes, simultáneamente con o después de la provisión de iones de litio o de una sal de éste en la superficie del implante, se puede proporcionar opcionalmente una nano y/o micro rugosidad en la superficie del implante utilizando, por ejemplo, grabado suave, microfabricación, anodizado, recubrimiento por proyección con llama, tratamiento electroquímico, láser, electroerosión o cualquier otro método adecuado de modificación superficial. Se puede hacer referencia a WO 04/008983 y a WO 04/008984, en las que se dan a conocer métodos adecuados para obtener una superficie del implante de ese tipo. Sin embargo se prefiere que la nano y/o micro rugosidad se proporcione después del paso a) en el método según la invención.

El método de la invención también puede comprender el paso de aplicación de flúor a la superficie del implante. Se puede hacer referencia a WO 04/008983, en la que se dan a conocer métodos adecuados para obtener una superficie del implante de ese tipo.

Un método adecuado, según WO 04/008983, para proporcionar flúor y/o fluoruro y una micro rugosidad con una rugosidad media cuadrática (Rq y/o Sq) de ≤ 250 nm en al menos una parte de la superficie del implante es mediante el tratamiento del implante con una solución acuosa de ácido fluorhídrico con una concentración menor a 0.5 M, por ejemplo de 0.1 M, por un período de grabado de hasta 180 s, por ejemplo de 60 s, a temperatura ambiente (véase WO 04/008983 por más información).

Además, se puede proporcionar opcionalmente una macro rugosidad en la superficie del implante antes de proporcionar los iones de litio o una de sus sales, y antes de proporcionar opcionalmente la micro rugosidad, sobre ella. Una macro rugosidad se puede proporcionar, por ejemplo, mediante granallado, por ejemplo con partículas de dióxido de titanio, grabado, microfabricación, anodizado, recubrimiento por proyección con llama, cualquier tratamiento electroquímico, láser, electroerosión, maquinado, moleteado o cualquier otro método adecuado de modificación superficial.

También se debe hacer constar que la superficie del implante puede ser roscada o sin roscar o se le pueden dar otras características topográficas dependientes del uso.

El método para fabricar un implante de tejido óseo según la invención no se limita a la incorporación de iones de litio,

sino que se puede aplicar para incorporar iones cargados positivamente en la superficie del implante en general. Por lo tanto, este método incluye los pasos de:

- a) proporcionar un implante dotado de una superficie de implante;
- b) formar una capa de óxido que recubra dicha superficie del implante;
- 5 c) formar iones cargados negativamente sobre dicha capa de óxido; y
- d) poner en contacto dicha capa de óxido con iones cargados positivamente.

Además se da a conocer un polvo de granallado, que contiene un óxido metálico, donde el óxido metálico está compuesto por iones de litio.

10 El óxido metálico puede ser un óxido metálico elegido del grupo que consiste en óxido de titanio, óxido de circonio, óxido de hafnio, óxido de tantalio y óxido de niobio. Preferentemente el polvo de granallado contiene óxido de titanio en el cual se incorporan iones de litio.

También es posible simplemente utilizar óxido de litio como polvo de granallado.

15 Puede ser posible utilizar dicho polvo de granallado en el método según la invención para mejorar aún más la incorporación de iones de litio en la capa de óxido que cubre la superficie del implante. Sin embargo, un polvo de granallado se puede utilizar por sí mismo, para incorporar los iones de litio en cualquier capa de óxido sobre cualquier superficie de un implante.

20 Además, se da a conocer un método para aumentar localmente la formación de hueso. Dicho método consiste en administrar una composición que contiene iones de litio o una de sus sales y un portador farmacéuticamente aceptable a una persona que lo necesita. Preferentemente, la composición que contiene iones de litio o una de sus sales y un portador farmacéuticamente aceptable se administra en un sitio de implantación en el momento de la implantación de un implante en el tejido óseo en dicho sitio de implantación, antes, simultáneamente con, o después de la colocación de dicho implante en una cavidad del tejido óseo en dicho sitio.

La composición compuesta por iones de litio o una de sus sales, se puede administrar dentro y/o en la proximidad de dicha cavidad del tejido óseo.

25 Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables adecuados para utilizar en dicha composición son una solución de suero fisiológico; hueso autólogo desintegrado; una matriz ósea desmineralizada; liposomas; nano o micropartículas de polímero(s) biodegradable(s), como ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA); ácido hialurónico; colágeno; sulfato de condroitina; un hidrogel como alginato; quitosano; un andamio de poliéster y fosfato tricálcico; y similares.

30 Un ejemplo específico de un portador adecuado es PepGen P-15 PUTTY™, que son partículas de hidroxiapatita combinada con P-15, un péptido sintético que imita la región de unión a la célula de colágeno tipo I, suspendido en hialuronato de sodio.

La composición descrita antes puede ser una formulación de liberación inmediata, de liberación retardada o de liberación controlada.

35 Los iones de litio o una de sus sales, se pueden utilizar para fabricar una composición farmacéutica (como la dada a conocer antes) para aumentar localmente la formación de hueso.

La composición se puede administrar localmente en un sitio de implantación en el momento de la implantación de un implante en el tejido óseo en dicho sitio.

40 Según los inventores de la presente, se prefiere la administración local de iones de litio o una de sus sales directamente en el tejido óseo a la administración sistémica. Los agentes extraños tienen a menudo una diversidad de efectos sobre el cuerpo humano, que son tanto conocidos como desconocidos. La administración local de litio o una de sus sales en el tejido óseo es beneficiosa ya que se puede lograr el efecto estimulante óseo evitando simultáneamente los efectos secundarios.

45 Además, la invención se refiere a un kit para la implantación de un implante en el tejido óseo que consiste en un implante y una composición (como la dada a conocer antes) compuesta por iones de litio o una de sus sales y un portador farmacéuticamente aceptable.

Si bien la invención se ha descrito en detalle y con referencia a sus realizaciones específicas, será evidente para un experto en el área que se pueden implementar diversos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la

misma según se define en las reivindicaciones.

La invención se ilustrará ahora por medio de los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Incorporación de iones de litio en una capa de óxido de titanio

5 Reducción en LiNO_3

Se redujeron muestras de titanio por la técnica de paso potencial en LiNO_3 0.1 M, pH 5-6. Se aplicó un paso potencial de -3V (todos los potenciales están referidos a un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl de doble unión, 197 mV contra SHE) sobre la muestra durante 5 minutos, resultando en un desprendimiento continuo de hidrógeno. Después del proceso de reducción las muestras se enjuagaron en agua MQ en un baño de ultrasonido durante 2 minutos antes de secarlas y esterilizarlas. La presencia y distribución de litio se identificó por espectrometría de masas de iones secundarios por tiempo de vuelo (TOF-SIMS) (Figura 1).

Anodizado en una solución alcalina

Se anodizaron muestras de titanio en LiOH 0.1 M, pH > 11 por LSV (voltametría de barrido lineal) de CA (circuito abierto) a 7 V (todos los potenciales están referidos a un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl de doble unión, 197 mV contra SHE), a una velocidad de lectura de 2 y/o 5 mV/s y una velocidad de rotación de 900 rpm. Después del proceso de anodizado las muestras se enjuagaron en agua MQ en un baño de ultrasonido durante 2 minutos antes de secarlas y esterilizarlas. La presencia de litio sobre la superficie de la muestra de titanio esterilizada se ilustra mediante el espectro de masas de la fig. 2a (pico 7), y se compara con una muestra de referencia de una muestra de titanio esterilizada tratada con ácido oxálico (fig. 2b).

20 La presencia y distribución de litio se identificó por TOF-SIMS (Figura 3).

Ejemplo 2: Liberación de litio de la superficie de un implante de titanio

Se redujeron muestras de titanio por la técnica de paso potencial en LiNO_3 0.1 M, pH 5-6. Se aplicó un paso potencial más negativo que -4V (todos los potenciales están referidos a un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl de doble unión, 197 mV contra SHE) sobre la muestra durante 5 minutos, resultando en un desprendimiento vigoroso de hidrógeno. Después del proceso de reducción las muestras se enjuagaron en agua y se secaron.

La liberación de litio se identificó por ISE (electrodo selectivo de iones) e ICP (plasma inductivamente acoplado). Cuatro muestras en forma de monedas, preparadas según lo anterior, se colocaron en un vaso con 15 ml de agua MQ. El agua se acidificó a pH 4 con HNO_3 20 mM y después se dejó durante 90 minutos con agitación moderada antes del análisis. La solución se analizó usando ISE e ICP, ambos análisis dieron el mismo resultado de 0.4 μg de litio/ml de muestra.

Ejemplo de referencia 1: Cultivo de células MG-63

MG-63 es una línea de células humanas (ATCC N° CRL-1427, U.S.) utilizada convencionalmente en el área para estudios *in vitro* de osteoblastos. MG-63 se origina de un osteosarcoma humano y presenta numerosos rasgos característicos de los osteoblastos humanos, como la fosfatasa alcalina (ALP) y la osteoprotegerina (OPG).

35 En este estudio, las células MG-63 se obtuvieron de células congeladas en el segundo pasaje y se cultivaron posteriormente en medio de Eagle modificado (DMEM) de Dulbecco que contenía 5% de FCS, 1% de PEST, Gibco, Reino Unido) a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 100% de humedad. Cuando las células alcanzaron la confluencia se subcultivaron mediante el uso de 0.05% de tripsina-EDTA (Gibco, Reino Unido) hasta que se obtuvo la cantidad de células.

40 La viabilidad de las células fue elevada en todos los experimentos (>98%) y se controló mediante el uso de azul de tripano donde la absorción del colorante por las células muertas se comprobó en un Bürkerchamber en un microscopio de luz (LM).

Ejemplo de referencia 2: Proliferación de células MG-63 y producción de fosfatasa alcalina (ALP)

45 Con el fin de estudiar el efecto del litio sobre la proliferación de las células MG-63 y la producción de fosfatasa alcalina (ALP), células MG-63 preparadas en el ejemplo de referencia 1 se subcultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de distribución de 10 000 células/ cm^2 , en total 20 000 células/pocillo. Se agregó LiNO_3 filtrado estéril a concentraciones finales de 10 mM, 5 mM, 3 mM y 1 mM, respectivamente (pH 5.2) a los respectivos pocillos de la placa. Se usaron células sin tratar como controles. Las células se cultivaron durante 3, 7 y 14 días a una temperatura de 37 °C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 100% de humedad.

El número total de células en cada pocillo ($\times 10^5$) después de cada período de tiempo se determinó por el método de NucleoCassette mediante el NucleoCounter (ChemoMetec A/S Dinamarca).

5 El número de células se investigó por lisis de las células en el "Reactivo A" que tenía pH de 1.25 luego de la estabilización con el "Reactivo B". En el NucleoCassette, se incorporó yoduro de propidio que se une a la cantidad de ADN liberado. El casete se colocó en el NucleoCounter y la cantidad de fluorocromo medida correspondió a la cantidad de ADN. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Chemometec A/S, Dinamarca).

10 En la recolección, se analizó el medio de cultivo celular con relación al contenido de fosfatasa alcalina. Se midió la fosfatasa alcalina intracelular mediante lisis celular según las instrucciones del fabricante (SenzoLyte™ pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit Colorimetric BioSite, Suecia). La absorción se fijó a 405 nm mediante un lector de placas automático (Vmax, Molecular Device, Reino Unido). Mediante la comparación de la densidad óptica de las muestras con el estándar suministrado con el kit, se pudieron determinar las concentraciones de fosfatasa alcalina. Se siguieron las instrucciones del fabricante (BioSite, Suecia).

Con referencia a la figura 4, se alcanzó un aumento de la proliferación de células MG-63 en los tres puntos temporales con litio 5, 3 y 1 mM. Se observó el mayor número de células detectadas después de 7 días.

15 La producción de fosfatasa alcalina fue inicialmente lenta con todas las concentraciones de litio en comparación con el control (células sin estimular). Se detectó un pequeño aumento después de 7 días en comparación con el control. Sin embargo, se detectaron mayores niveles de fosfatasa alcalina después de 14 días con todas las concentraciones de litio; 1 mM, 3 mM, 5 mM y 10 mM. La mayor cantidad de fosfatasa alcalina se observó con litio 1 mM después de 14 días. Los resultados se ilustran en la figura 5.

20 Ejemplo de referencia 3: Preparación de superficies de referencia

Se limpiaron muestras de titanio con la forma de una moneda y luego se sumergieron en una solución acuosa de ácido oxálico 1 M y se dejaron a 80 °C durante 30 minutos con agitación vigorosa. Después de 30 minutos las muestras se extrajeron de la solución de ácido oxálico y se enjuagaron en agua seguido de enjuague en agua en un baño de ultrasonido durante 2 minutos. La superficie resultante se denomina "superficie de referencia 1".

25 Algunas de las muestras se sometieron a un tratamiento secundario con ácido fluorhídrico. Aproximadamente 10 minutos después de enjuagar, las muestras se sumergieron en una solución acuosa de HF 0.1 M a temperatura ambiente y se agitaron hasta el inicio de la disolución activa, seguido de un tiempo de tratamiento activo adicional de 40 s. A continuación, las muestras se extrajeron de la solución de HF y se enjuagaron en agua seguido de enjuague en agua en un baño de ultrasonido durante 2 minutos. Las muestras se secaron en el aire a temperatura ambiente durante alrededor de 60 minutos antes de la esterilización. La superficie resultante se denomina "superficie de referencia 2"

Ejemplo de referencia 4: Proliferación de MG-63 en las superficies de referencia

35 Se colocaron monedas de Ti esterilizadas (radiación β) con superficies de referencia 1 y 2, respectivamente, en placas de 24 pocillos. Las células MG-63 se subcultivaron sobre las monedas en las placas de 24 pocillos a una densidad de distribución de 10 000 células/cm², en total 20 000 células/pocillo. Se agregó LiNO₃ filtrado estéril a concentraciones finales de 5 mM y 1 mM (pH 5.2) a los respectivos pocillos. Se usaron células sin tratar como controles. Las células se cultivaron durante 7 días a una temperatura de 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad.

40 La superficie de referencia 1 que contenía litio a una concentración de 1 mM indujo un aumento de la proliferación de las células MG-63 después de 7 días de cultivo. La superficie de referencia 2 que contenía litio a una concentración de 1 mM indujo una elevada proliferación de las células después de 7 días de cultivo celular en comparación con la superficie de referencia 2 sin estimular. La concentración final de litio de 5 mM indujo un modesto aumento de la proliferación. Los resultados se ilustran en la figura 6.

Ejemplo de referencia 5: Producción de fosfatasa alcalina en la superficie de referencia 1

45 La producción de fosfatasa alcalina en la superficie de referencia 1 que contenía una concentración de litio 1 mM se comparó con la superficie de referencia 1 sin estimular que no contenía litio.

Como se ilustra en la figura 7, la producción de fosfatasa alcalina aumentó con litio 1 mM después de 7 días de cultivo celular.

Ejemplo de referencia 6: Morfología

50 Se prepararon muestras de titanio que tenían (i) superficie de referencia 1 (ii) superficie de referencia 2 y (iii) superficie de referencia 1 + litio para microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras se fijaron con glutaraldehído a + 4 °C (Kanowsky), seguido de tetróxido de osmio, deshidratación y finalmente oro pulverizado

según las técnicas estándar.

5 Las figuras 8, 9 y 10 ilustran la morfología de la superficie respectiva después de 36 h. La superficie de referencia 1 que contenía litio tiene una mayor cantidad de células en fase proliferativa (fig. 10) (células redondas, no dispersas) así como una gran cantidad de células adhesivas en comparación con las células de las superficies de referencia 1 y 2 que no contenían litio. Tanto en la superficie de referencia 1 (Figura 8) como en la superficie de referencia 2 (Figura 9) las células son más delgadas, más planas y más dispersas.

El espacio entre las células en las superficies de referencia 1 y 2 es probablemente debido a las dificultades de fijación y a menudo se ve cuando las células son muy delgadas y muy dispersas.

10 La morfología de las células cultivadas en la superficie de referencia 1 que contenía litio muestra que las células están bien dispersas, indicando alta actividad, proliferan y forman matriz y pseudópodos en las superficies. Esto indica que dichas superficies son osteoconductoras así como osteoconductoras y favorables para la adhesión celular, la proliferación y la formación de matriz.

Ejemplo comparativo 1: Proliferación de MG-63 en superficies de referencia que contienen litio, calcio y magnesio, respectivamente

15 Se compararon monedas de Ti esterilizadas (radiación β) con superficies de referencia 1 y 2, con monedas de Ti con superficie de referencia 1 que contenía litio, calcio y magnesio, respectivamente, y las monedas se colocaron en placas de 24 pocillos. Las células MG-63 se subcultivaron sobre las monedas en las placas de 24 pocillos a una densidad de distribución de 10 000 células/cm², en total 20 000 células/pocillo. Las células se cultivaron durante 7 días a una temperatura de 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad.

20 El número total de células en cada pocillo ($\times 10^5$) después de cada período de tiempo se determinó por el método de NucleoCassette mediante el NucleoCounter (ChemoMetec A/S Dinamarca).

25 El número de células se investigó por lisis de las células en el "Reactivo A" que tenía un pH de 1.25 luego de la estabilización con el "Reactivo B". En el NucleoCassette, se incorporó yoduro de propidio que se une a la cantidad de ADN liberado. El casete se colocó en el NucleoCounter y la cantidad de fluorocromo medida correspondió a la cantidad de ADN. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Chemometec A/S, Dinamarca).

Con referencia a la figura 11, la proliferación con la superficie de referencia 1 que contenía litio mostró la mayor proliferación de células MG-63 después de 7 días de cultivo celular. La proliferación celular fue marcadamente superior que con las superficies de referencia que contenían calcio y magnesio.

Ejemplo comparativo 2: Producción de osteoprotegerina en la superficie de referencia 1

30 Se comparó la producción de osteoprotegerina (OPG) entre monedas de Ti con superficie de referencia 1 que contenía litio, calcio y magnesio, respectivamente.

35 La cantidad de OPG se determinó mediante DuoSet ELISA OPG humana/TNFRSF11 B (R&D Systems, Reino Unido). Se centrifugó el sobrenadante de cada pocillo exento de células (5 min en 400g) y después se utilizó para investigación. Las concentraciones de las muestras de OPG se determinaron correlacionando las cantidades con la curva estándar provista por el fabricante. La sensibilidad de la prueba (MDD, dosis mínima detectable) fue de 50 pg/ml. Se siguieron las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Reino Unido).

Como se ilustra en la figura 12, la mayor producción de OPG se observó con la superficie de referencia 1 que contenía litio después de 7 y 14 días de cultivo celular.

Comparativo ejemplo 3: Respuesta del tejido óseo *in vivo*

40 La integración de los implantes según la invención se probó en un modelo de conejo. El objetivo fue estudiar cualitativamente y cuantitativamente la respuesta *in vivo* del tejido óseo a las modificaciones de la superficie del implante según la invención en comparación con un implante de control comercial.

Implantes para el estudio de torque de remoción

45 Se compararon accesorios de torque (diseño para torque de remoción de cabeza cuadrada, 3.5 x 8.2 mm) con una superficie de referencia 1 que contenía litio, con accesorios de torque de control (3.5 x 8.2 mm) con la superficie Osseospeed™ comercial.

Inserción del implante

Se programaron para cirugía doce conejos machos, maduros, blancos, New Zeland. Dos conejos murieron durante la anestesia inicial (Nº 9, 10). La cirugía fue sin incidentes. Se hizo una perforación a baja velocidad (1500 rpg para

la perforación de los orificios y 20 rpm para la inserción del implante) con enfriamiento continuo con NaCl. La primera broca fue un buril redondo pequeño y por lo tanto se utilizó como un marcador para las próximas brocas en espiral más grandes (en conjunto 6 brocas con diámetros en el intervalo de 1.2 a 3.35 mm).

5 Se insertaron tres implantes ("diseño para torque de remoción de cabeza cuadrada"; 3.5 x 8.2 mm) en cada tuberositas tibia. Se programaron implantes de tibia para pruebas de torque de remoción.

Resultados del torque de remoción

Después de seis semanas el estudio culminó y los conejos se sacrificaron. Se examinaron los implantes y el tejido circundante. Los implantes de tibia rtq fueron fáciles de localizar y todos ellos mostraron signos de crecimiento de tejido óseo perióstico. La prueba biomecánica de la interfaz hueso-implante se realizó con la prueba de torque de remoción (RTQ). El instrumento de RTQ es un equipo electrónico (Detektor AB, Gotemburgo, Suecia) que involucra un transductor de galga extensiométrica utilizado para probar la estabilidad del implante (el torque de aflojamiento máximo en Ncm) en el lecho óseo y puede así considerarse como una prueba tridimensional que refleja más o menos la resistencia a la cizalladura interfacial entre el tejido óseo y el implante (Johansson C. B., Albrektsson T. Clin Oral implants Res 1991; 2:24-9). Se aplicó un torque lineal creciente sobre el mismo eje del implante hasta que se obtuvo un fracaso de la integración y se observó el valor máximo.

Como se ilustra en la figura 13, el valor del torque de remoción para el implante que contiene litio según la invención mejoró en comparación con la superficie Osseospeed™ comercial.

20

25

30

35

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un implante para la implantación en el tejido óseo dotado de una superficie; dicho implante es un implante metálico o un implante no metálico provisto de una superficie metálica; dicha superficie está cubierta por una capa de óxido que contiene iones de litio que se caracteriza porque dicha capa de óxido tiene un espesor del orden de 2 a 100 nm.
2. Un implante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha capa de óxido tiene un espesor del orden de 2 a 18 nm, por ejemplo de 2 a 6 nm.
3. Un implante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha capa de óxido es una capa de óxido metálico formada a partir de dicha superficie de dicho implante.
- 10 4. Un implante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que contiene además un depósito por encima de dicha capa de óxido, donde dicho depósito contiene un agente estimulante óseo.
5. Un implante de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho agente estimulante óseo se elige del grupo que consiste en litio, estroncio, magnesio y calcio o una combinación de éstos.
- 15 6. Un implante de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que dicho depósito es una precipitación de sal que contiene cualquiera o una combinación de iones elegidos entre litio, estroncio, magnesio y calcio.
7. Un implante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha superficie de dicho implante contiene flúor.
- 20 8. Un método para fabricar un implante de tejido óseo dotado de una superficie de implante, donde dicho implante es un implante metálico o un implante no metálico provisto de una superficie metálica, donde dicha superficie metálica está cubierta por una capa de óxido que tiene un espesor del orden de 2 a 100 nm y contiene iones de litio, donde dicho método comprende los pasos de:
- a) proporcionar un implante dotado de una superficie de implante;
 - b) formar una capa de óxido que recubra dicha superficie del implante;
 - c) formar iones cargados negativamente sobre dicha capa de óxido; y
 - 25 d) poner en contacto dicha capa de óxido con iones de litio.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha capa de óxido se forma espontáneamente.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que dichos iones cargados negativamente sobre dicha capa de óxido se forman sometiendo dicha superficie del implante a un ambiente alcalino.
- 30 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho paso c y dicho paso d se realizan simultáneamente.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicha capa de óxido se pone en contacto con iones de litio sometiendo dicha capa de óxido a una solución que contiene iones de litio.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que comprende además el paso de formar un depósito que contenga un agente estimulante óseo por encima de dicha capa de óxido.
- 35 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho agente estimulante óseo se elige del grupo que consiste en litio, estroncio, calcio y magnesio o una combinación de éstos.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, donde dicho depósito se forma mediante precipitación de una sal que contenga cualquiera o una combinación de los iones elegidos entre litio, estroncio, calcio y magnesio sobre dicha capa de óxido.
- 40 16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, que comprende además el paso de aplicar flúor a dicha superficie de dicho implante.

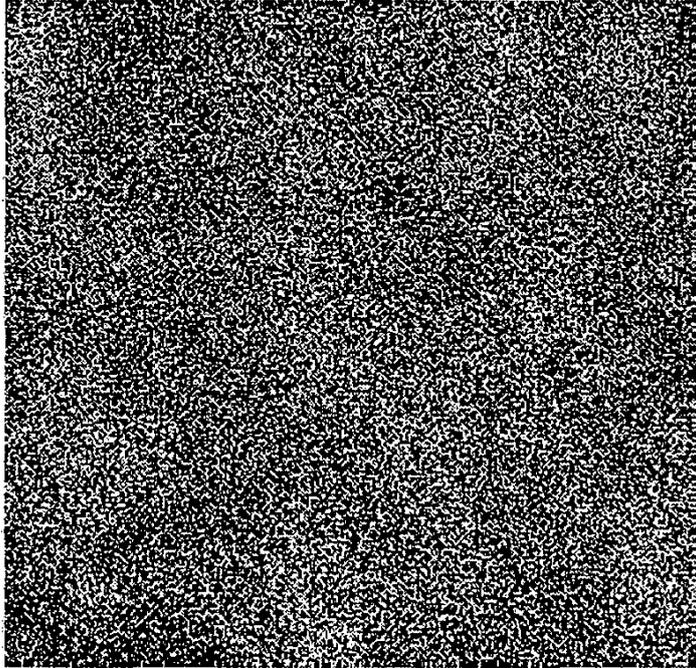


Fig. 1

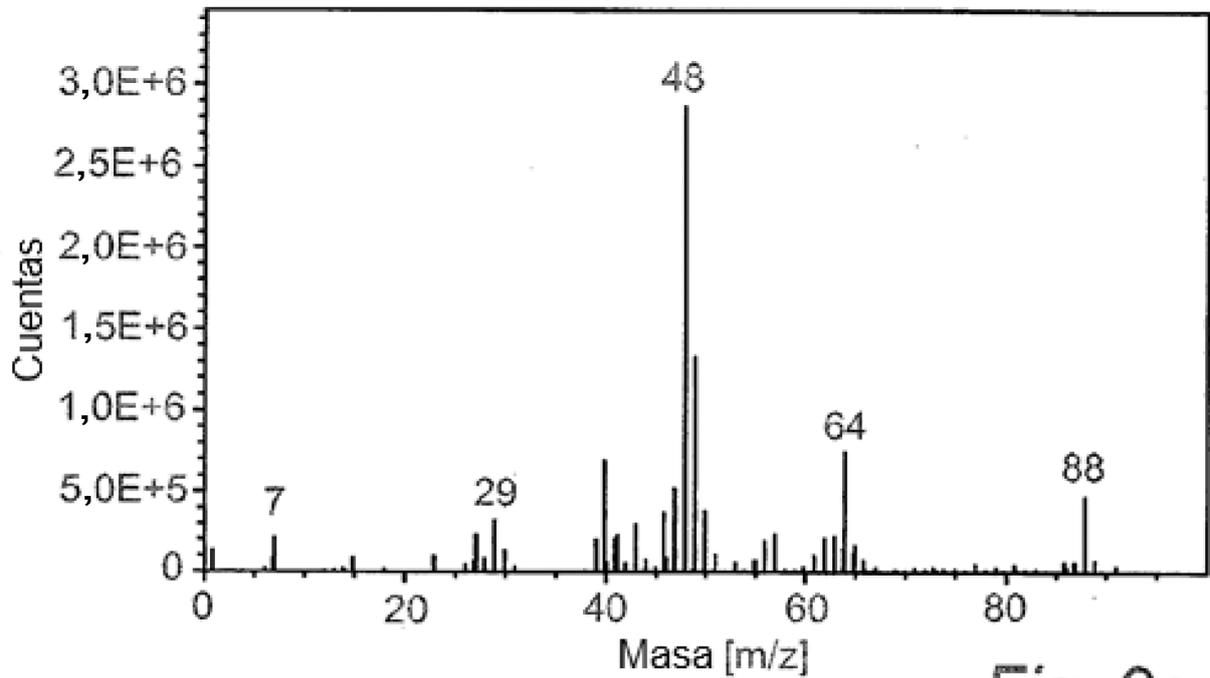


Fig. 2a

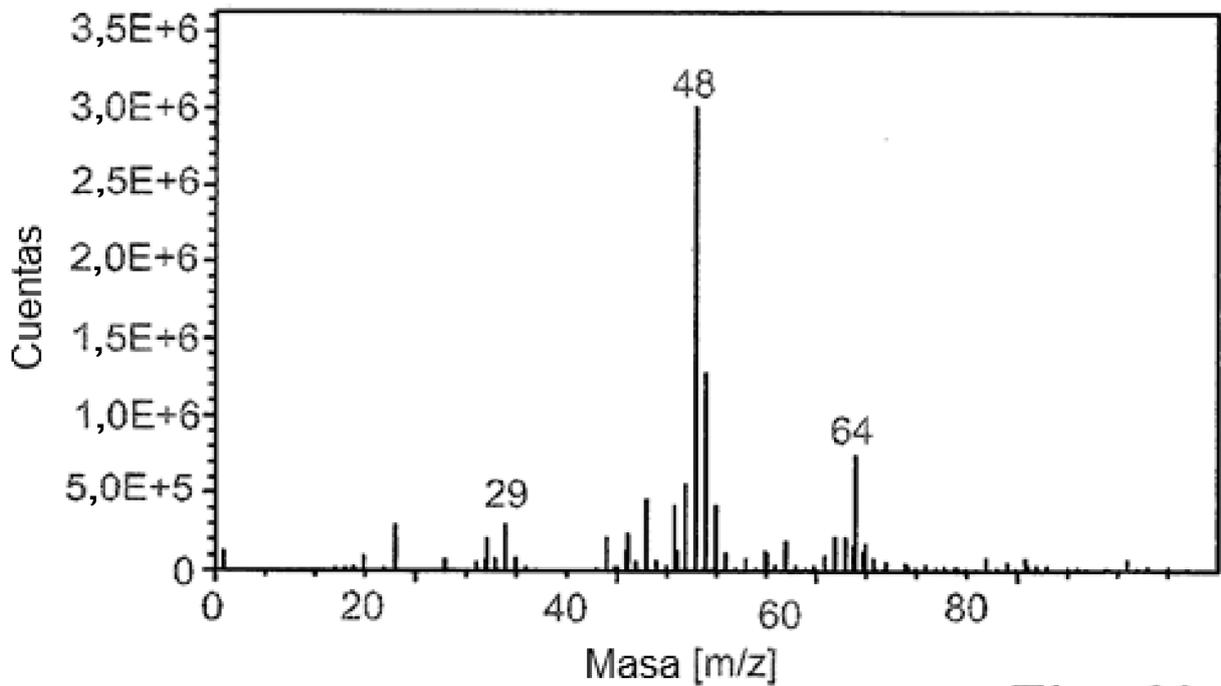


Fig. 2b

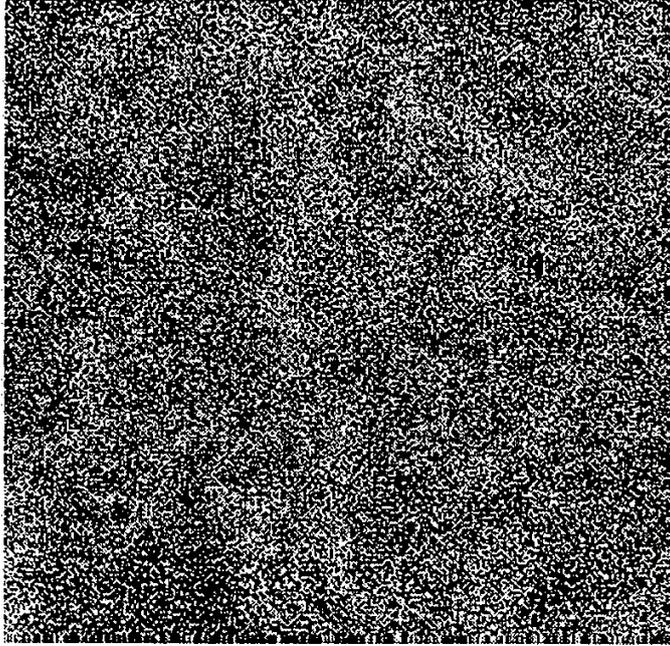


Fig. 3

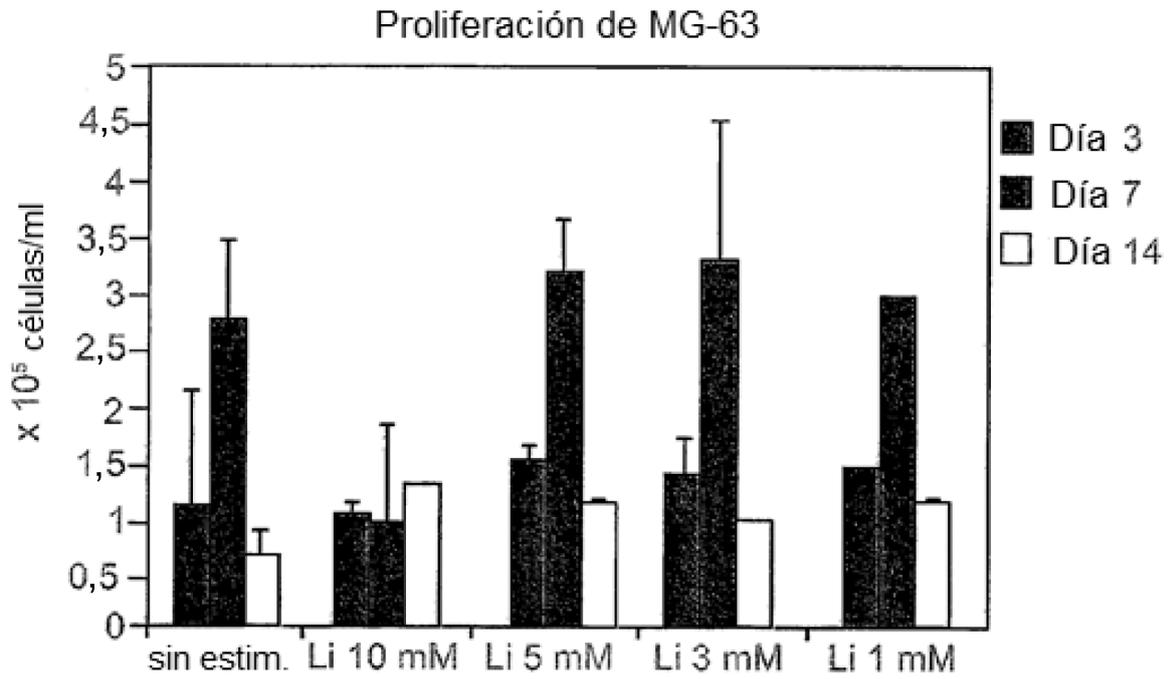


Fig. 4

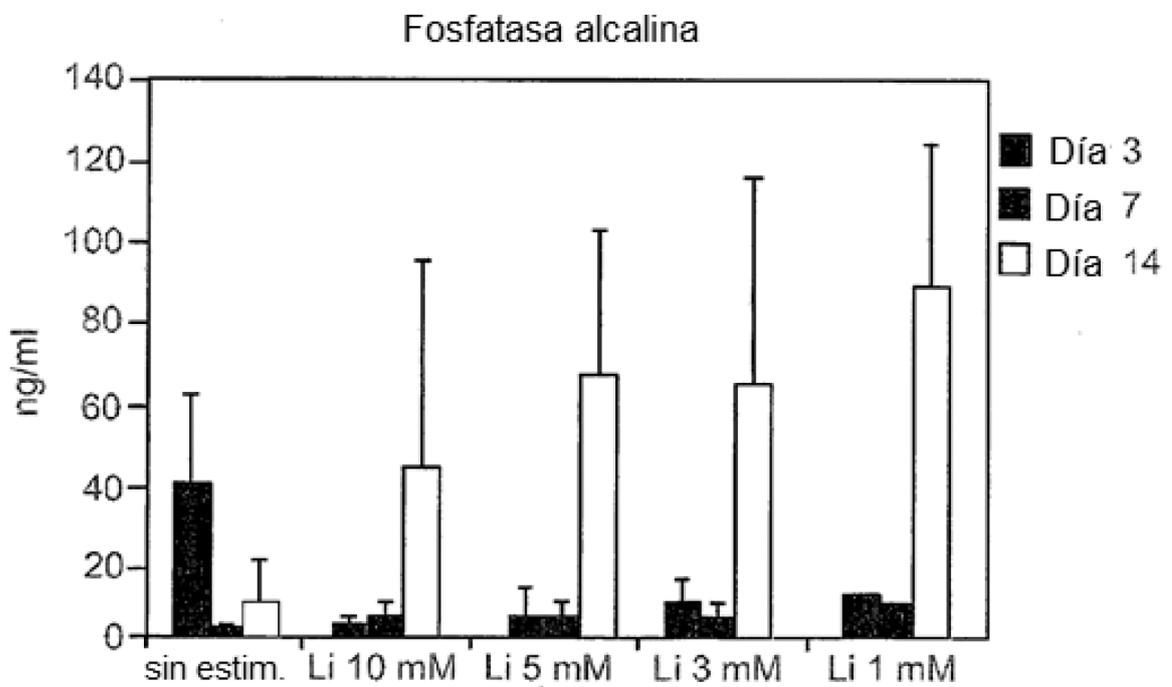


Fig. 5

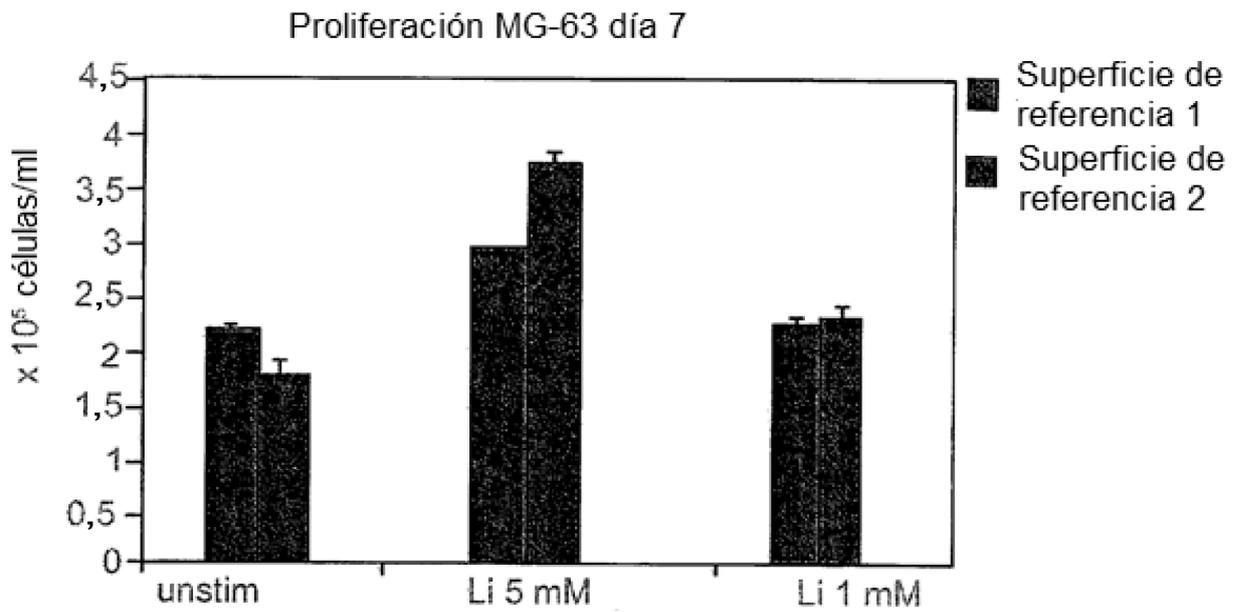


Fig. 6

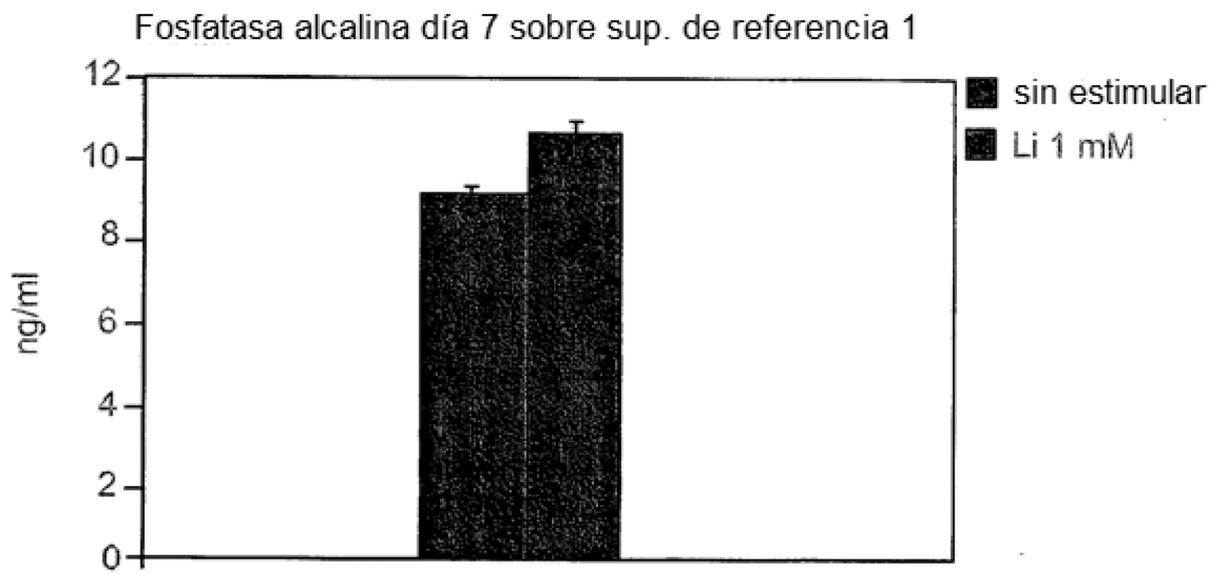


Fig. 7

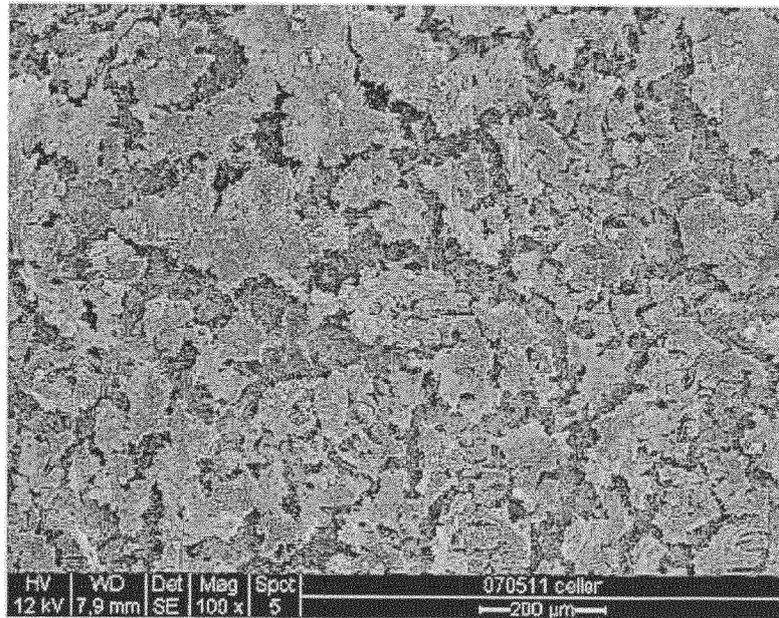


Fig. 8

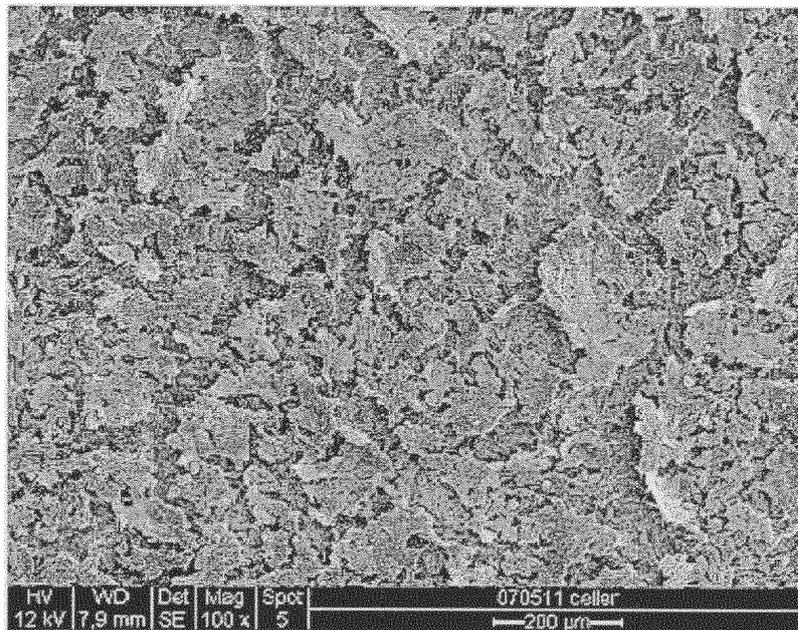


Fig. 9

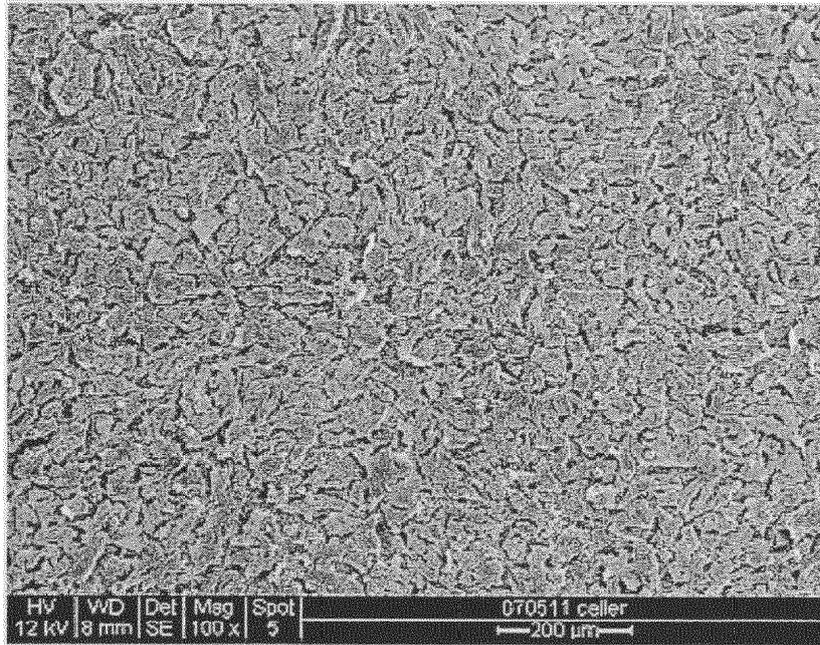


Fig. 10

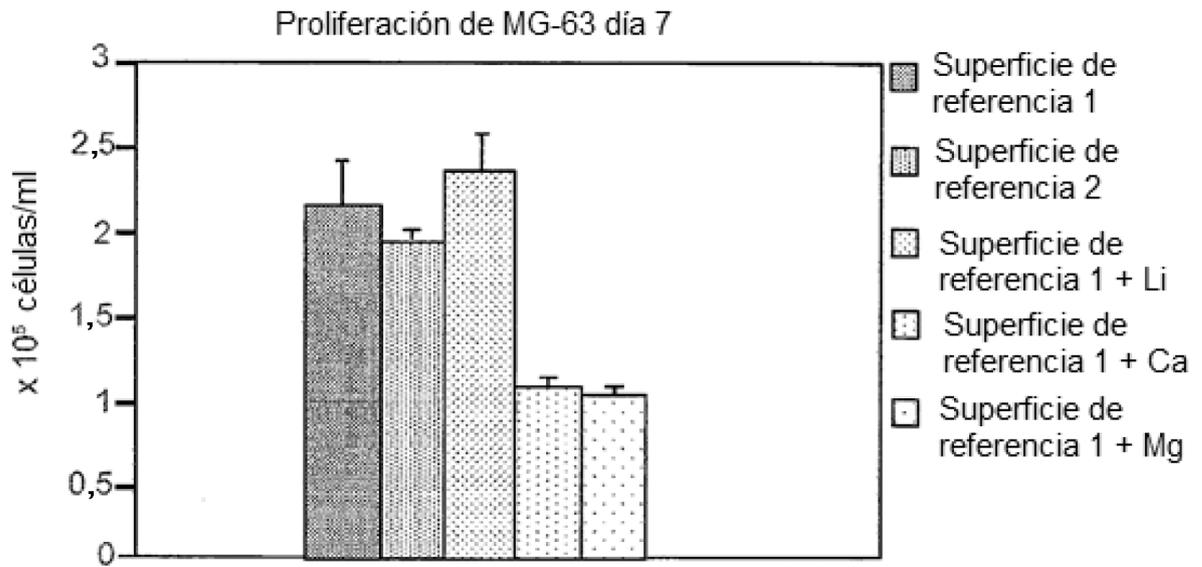


Fig. 11

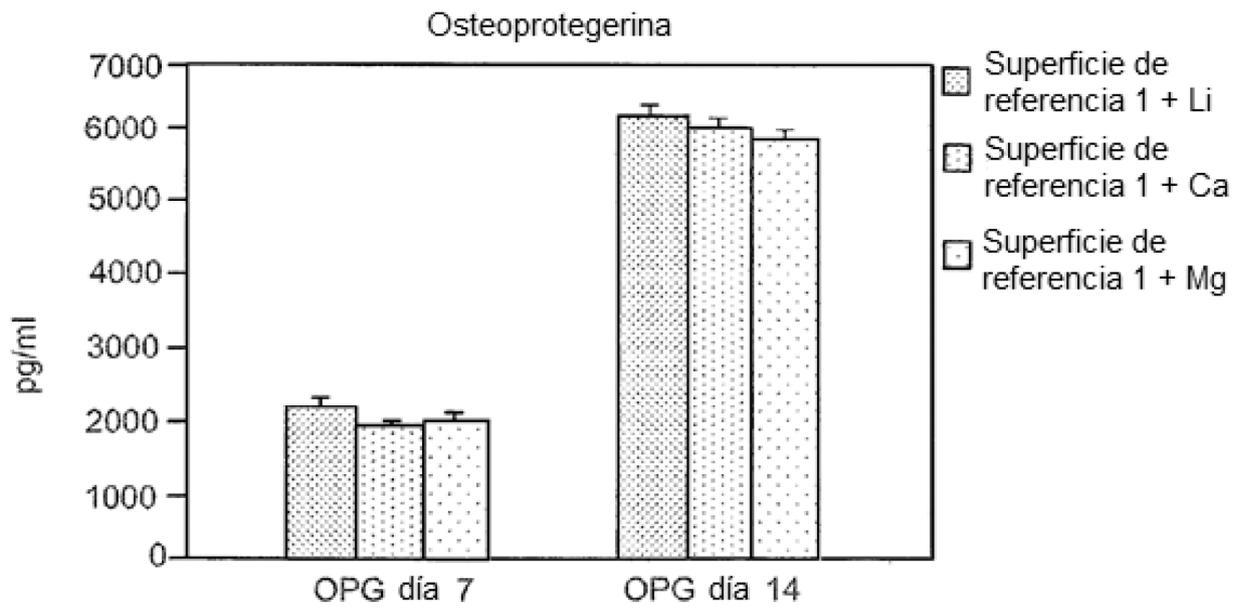


Fig. 12

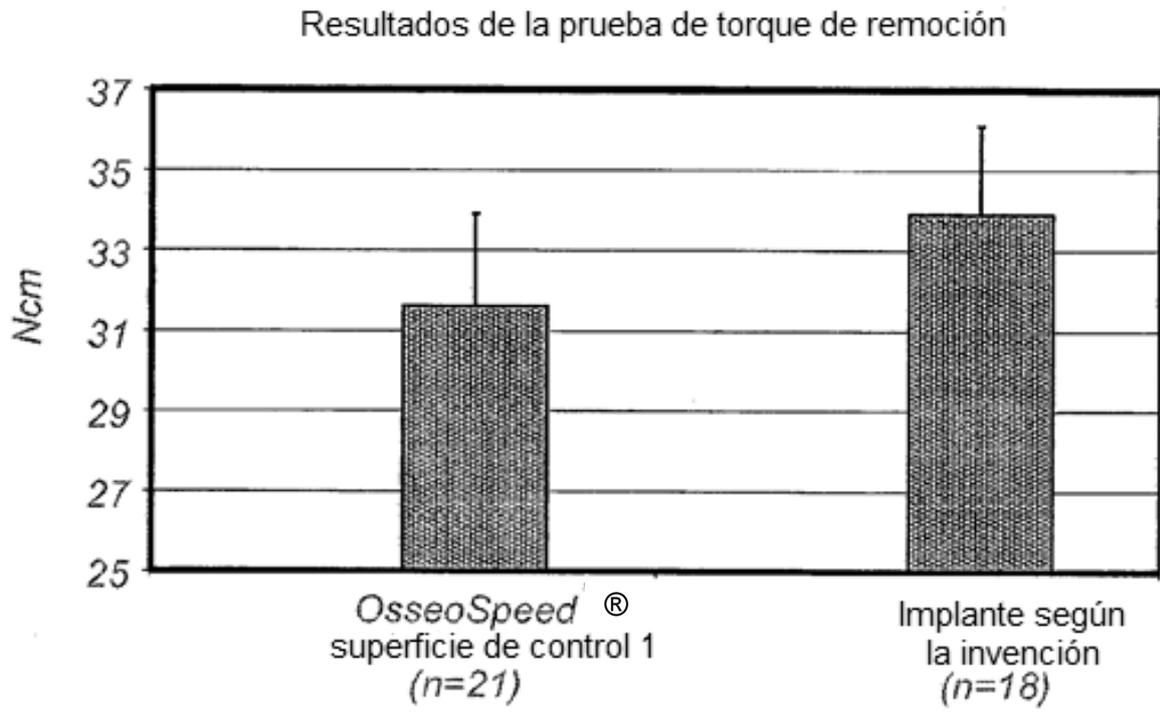


Fig. 13