

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 213**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2004 PCT/IB2004/003260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2006 WO06038056**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2004 E 04769570 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 1796753**

54 Título: **Dispositivo de implante óseo recubierto de ácido hialurónico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2019

73 Titular/es:
NOBIL BIO RICERCHE S.R.L. (100.0%)
Via della Stella 64
25062 Concesio (BS), IT

72 Inventor/es:
GAZZA, GIANLUCA

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 730 213 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

Dispositivo de implante óseo recubierto de ácido hialurónico

5 **Descripción**

La presente invención se refiere a un dispositivo de implante óseo, particularmente para prótesis dentales y prótesis ortopédicas en la columna vertebral, que proporciona una osteointegración más rápida que los dispositivos de la técnica anterior.

10

Antecedentes de la invención

El uso de dispositivos metálicos implantables de manera permanente en tejido óseo está extendido en diversas ramas de la medicina. Por ejemplo, la cirugía de implante dental proporciona el uso de tornillos, generalmente hechos de titanio, en la mandíbula inferior o huesos maxilares para reemplazar de manera artificial raíces óseas perdidas o ya no funcionales. En ortopedia, varios dispositivos para fijación de fractura, reducción de la movilidad vertebral, cirugía de columna vertebral, se implantan normalmente en tejido óseo.

15

En estas aplicaciones, el dispositivo implantado se fija firmemente en el sitio de implante debido al crecimiento, hasta tener contacto directo con el dispositivo, de tejido óseo de nueva formación. Este fenómeno, que se conoce como osteointegración, se ha descrito y estudiado ampliamente en la bibliografía tecnicocientífica del sector, particularmente en lo que se refiere a cirugía de implante óseo mediante dispositivos de titanio. Contrariamente a otros procedimientos de implante de material extraño en tejidos, que supone la encapsulación en un material fibroso, es decir integración fibrosa, el crecimiento de tejido óseo en contacto directamente con el dispositivo ofrece un anclaje firme, que hace que el dispositivo sea adecuado para soportar cargas y llevar a cabo labores estructurales.

20

25

Aunque las disciplinas basadas en osteointegración están teniendo recientemente gran éxito y aplicaciones siempre crecientes, varios problemas siguen todavía sin resolver. Particularmente, es importante acelerar el proceso de osteointegración tanto como sea posible, reduciendo de este modo el tiempo entre la inserción del implante y la carga real sobre el mismo. Por ejemplo, en odontología el implante no se "carga" generalmente, de este modo el paciente no puede llevar a cabo su función masticatoria mediante ese implante, por un periodo de tiempo que oscila entre 1 y 4 meses después de la intervención, con el fin de permitir la curación del tejido óseo e inducir osteointegración. Además, mientras que los huesos normalmente curan bien en gente joven y sana, a menudo lo hacen de manera muy lenta en gente mayor y con osteoporosis, es decir aquellos que más probablemente requieran estas intervenciones y que son una porción significativa de los pacientes que requieren operaciones de implantes por traumatismo o fijación de la movilidad espinal.

30

35

Puesto que se conoce de manera general que las propiedades de superficie de los dispositivos de implante desempeñan un papel básico en la respuesta del tejido al implante, se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios para mejorar el proceso de osteointegración mediante la modificación de la superficie de los dispositivos implantables. Una imagen detallada de estos estudios se expone en "*The bone-biomaterial interface*" de Puleo y Nancy, Biomaterials 1999; 20:2311-2321, o el libro de texto *Bone Engineering*, Davies, publicado por EM SQUARED, Toronto, 2000. A partir del estudio de estos libros y evaluando los dispositivos comercializados, se entiende que se persigue normalmente la mejora de las propiedades de la superficie dando aspereza a la superficie, por ejemplo mediante tratamiento con chorro de arena, deposición por pulverización de plasma o tratamientos con ácidos. También se ha estudiado y aplicado la deposición de capas de materiales de cerámica con alta afinidad ósea, tales como la hidroxiapatita o el denominado biovidrio.

40

45

El documento de la técnica anterior US 5.759.295 da a conocer un implante dental u ortopédico biocompatible que comprende una prótesis que tiene al menos una superficie en contacto con tejido de un material polimérico cargado negativamente, teniendo dicho material polimérico cargado negativamente una carga monopolar global que produce un campo electrostático externo, de manera que se promueve el crecimiento hacia el interior de células óseas y la adherencia a la prótesis.

50

El documento de la técnica anterior WO 00/56377 da a conocer la modificación de la superficie de un dispositivo médico con una capa de ácido hialurónico unida al mismo para inhibir la adherencia de plaquetas y ciertos tipos de células a las superficies del dispositivo puestas en contacto con plaquetas y células y la mineralización del dispositivo.

55

El documento de la técnica anterior DE 10223310 da a conocer un método para recubrir implantes cardiovasculares, que no implica la reacción de grupos amina en el sustrato del dispositivo médico con los grupos hidroxilo funcionalizados del ácido hialurónico.

60

Además de estos métodos, se ha levantado gran interés en la introducción en la superficie de los dispositivos de implante de moléculas biológicas capaces de promover el crecimiento óseo. Entre las moléculas más estudiadas, se ha notificado que el colágeno, cuando se inmoviliza en la superficie un tornillo de titanio de implante, puede

65

5 aumentar la velocidad de la osteointegración. También se ha demostrado que son eficaces péptidos particulares, es decir fragmentos moleculares pequeños que componen moléculas proteicas, que son capaces de interactuar particularmente con células óseas, cuando se someten a prueba *in vivo*. Para el propósito, el artículo mencionado anteriormente de Puleo y Nancy estudia las varias moléculas usadas para llevar a cabo la modificación bioquímica de superficies de implante.

10 Aunque la modificación bioquímica de superficies de implante es un sector de gran interés científico y especulativo, su aplicación práctica todavía tiene problemas considerables. El colágeno, por ejemplo, tiene problemas de contaminación ya que se origina de fuentes animales cuestionables (particularmente, colágeno bovino) o rechazo debido a posibles reacciones de incompatibilidad entre diferentes especies. Los péptidos mencionados anteriormente son más bien costosos y escasamente estables desde un punto de vista químico, de manera que recurrir a los procedimientos típicos del sector, por ejemplo la esterilización, en el tratamiento de superficies de implante es difícilmente factible.

15 El ácido hialurónico es un glucosaminoglucano difundido en todos los tejidos de los seres vivos, sin ninguna variación entre especies. Tiene características bioquímicas y de hidratación muy interesantes y, por este motivo, se estudia y usa ampliamente en diversas especialidades dentro del campo biomédico. Un resumen exhaustivo de la aplicación del último se expone, por ejemplo, en algunos trabajos que contienen los procedimientos de las principales conferencias sobre ácido hialurónico: "The Biology of Hyaluronan", D. Evered y J. Whelan, Eds. Wiley, Chichester, 1989, "The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives", T. C Laurent, Ed., Portland Press Ltd, London, 1998, "Redefining Hyaluronan", G. Abatangelo y P. H. Weigel, (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2000, "Hyaluronan", J. F. Kennedy, G. O. Phillips, P. A. Williams, V. Hascall, Eds., Wodhead Publishing Limited, 2002.

25 El ácido hialurónico, como molécula en la fase homogénea, desempeña un papel activo en el proceso de formación ósea, tal como describen, por ejemplo, Bernard *et al.* en el trabajo mencionado anteriormente "Redefining Hyaluronan", G. Abatangelo y P. H. Weigel, (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2000, p. 215.

30 Por este motivo, se han usado geles basados en ácido hialurónico impregnados de proteínas morfogénicas óseas o factores de crecimiento de manera exitosa en pruebas de estimulación ósea. Además, se ha demostrado que disoluciones de ácido hialurónico, opcionalmente acopladas con el fármaco dexametasona que tiene propiedades osteogénicas, ejercen un efecto positivo sobre la especialización en células óseas de células estromales de la médula ósea, tal como describen Zou *et al.*, *Biomaterials*, 2004; 5375-5385, 25.

35 Sin embargo, la interesante potencialidad osteogénica del ácido hialurónico, o bien como gel o bien en disolución, o el ácido hialurónico presente en tejidos, no puede usarse de manera inmediata en los dispositivos de implantación en tejido óseo tal como se describió anteriormente. De hecho, el ácido hialurónico es muy soluble en disoluciones acuosas y su tiempo de permanencia *in situ* es muy corto. Técnicas químicas que favorecen la permanencia del ácido hialurónico en el sitio de implante, tales como reticulación, modificación química o inmovilización en la superficie, pueden alterar la estructura y configuración molecular del ácido hialurónico y afectar negativamente a las interacciones específicas receptor-ligando, comprometiendo de ese modo el comportamiento bioactivo de la molécula. De hecho, las propiedades bioactivas del ácido hialurónico se derivan de su capacidad de interactuar con receptores específicos ubicados en la pared celular, tales como CD44 o RHAMM. Tal como describen J. Lesley *et al.*, *J Biol Chem.* 1 de sept. de 2000; 275(35):26967-75, este tipo de interacción es altamente cooperativa y, con el fin de ser eficaz, requiere la interacción simultánea de muchas repeticiones de ácido hialurónico con un único receptor. La naturaleza cooperativa de la interacción implica la movilidad típica de moléculas en disolución, por tanto la inmovilización del ácido hialurónico sobre superficies de materiales, tal como describen Morra y Cassinelli, *Journal of Biomaterials Science*, Polymer Edition, 1999; 10(10):1107-24, conduce a superficies que no permiten ninguna adhesión celular debido a la incapacidad de establecer interacciones específicas que sean suficientemente fuertes. La reducida adhesión de células o biomoléculas o superficies con ácido hialurónico inmovilizado se sustenta en diversos artículos de la bibliografía científica y se usa, tal como exponen Witt *et al.*, "Hyaluronan", J. F. Kennedy, G. O. Phillips, P. A. Williams, V. Hascall, Eds., Wodhead Publishing Limited, 2002, volumen 2, p. 27, para reducir fenómenos de adhesión subsiguientes a operaciones quirúrgicas. La inmovilización de ácido hialurónico sobre dispositivos y sustratos metálicos se ha notificado por Pitt *et al.*, en el artículo: "Attachment of hyaluronan to metallic surfaces", publicado en *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 68, p. 95, 2004. Según conocimiento general, tal como se describió anteriormente, en el artículo citado las superficies con ácido hialurónico inmovilizado sobre las mismas se designan como que son "biopasivas" o con escasa adhesión celular. Los autores del artículo señalan cómo la escasa adhesión biológica otorgada por la capa de ácido hialurónico inmovilizado puede usarse para evitar la adhesión inespecífica; y cómo, con el fin de obtener un efecto de bioadhesión específico, es necesario unir péptidos de adhesión a esta matriz no adhesiva.

65 Esencialmente, se reconoce generalmente que capas de ácido hialurónico inmovilizadas sobre superficies sólidas tienen características de resistencia a la adhesión biológica, que es opuesto a lo que se desearía obtener mediante la acción bioactiva del ácido hialurónico inmovilizado sobre dispositivos de implantación, en los que la adhesión celular específica del implante al tejido óseo es crucial para la osteointegración.

Se reconoce además que el proceso de neoformación ósea requiere una etapa de mineralización promovida por iones de calcio que se unen a la superficie. Tal como describen Bernard *et al.* en el trabajo mencionado anteriormente, el ácido hialurónico, por naturaleza, tiene un efecto activo en esta etapa, contribuyendo de ese modo de manera significativa al proceso de calcificación. Los grupos carboxilato del ácido hialurónico pueden, de hecho, 5
 10 quelar o complejar iones de calcio ejerciendo una acción positiva sobre el proceso de mineralización. Sin embargo, la inmovilización de ácido hialurónico sobre la superficie de dispositivos de implante normalmente implica unir los grupos carboxílicos del ácido hialurónico con funcionalidades amínicas o hidroxilo presentes en el sustrato, con la consecuente pérdida, en el ácido hialurónico unido, de grupos carboxílicos que están disponibles para la quelación con iones de calcio. Por consiguiente, la inmovilización del ácido hialurónico sobre la superficie de estos dispositivos mediante los métodos conocidos no conduce a ninguna mejora en el proceso de osteointegración.

Por otro lado, el presente solicitante ha encontrado de manera sorprendente que el ácido hialurónico inmovilizado sobre tornillos de implante, según lo que se expone en las reivindicaciones adjuntas, tiene un efecto activo sobre el proceso de osteointegración *in vivo*, sin que se requiera ninguna inmovilización de péptido adicional, y que las propiedades de aquellos dispositivos que pueden implantarse por contacto con tejido óseo que tienen una capa de ácido hialurónico inmovilizado según la invención definitivamente se mejoran en comparación con dispositivos convencionales. 15

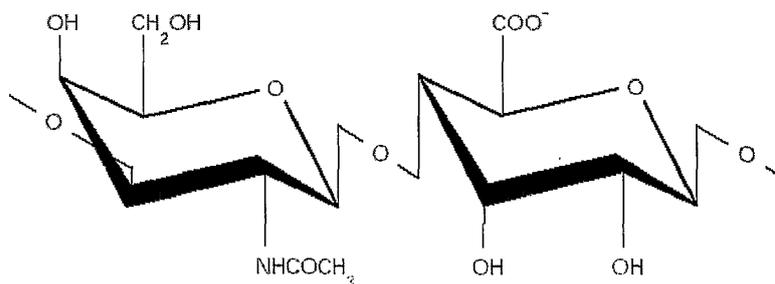
Descripción de la invención

En la más amplia realización de la misma, la presente invención se refiere a un dispositivo de implante en tejido óseo (definido como "dispositivo de implante" en el presente documento a continuación), de naturaleza metálica o de polímero, a una capa de ácido hialurónico unido químicamente sobre la superficie del mismo, tal como se define en la reivindicación 1 adjunta. No se han establecido limitaciones a la forma o naturaleza del dispositivo, con la condición de que se destine a aplicaciones que proporcionan o bien el crecimiento del tejido óseo en contacto con el mismo o bien, generalmente, la estimulación del crecimiento de tejido óseo. 20
 25

En una realización particularmente ventajosa de esta invención, el dispositivo consiste en un tornillo de implante dental, preferiblemente hecho de titanio o aleaciones del mismo, o un tornillo, preferiblemente hecho de titanio o aleaciones del mismo, para fijación esquelética o espinal, o de un disco intervertebral, preferiblemente hecho de titanio, aleaciones del mismo o aleaciones de cromo-cobalto o aleaciones metálicas usadas comúnmente con estas aplicaciones, o una jaula, preferiblemente hecha de titanio o aleaciones del mismo. 30

Una capa fina de ácido hialurónico, preferiblemente de 0,5 a 10000 nm, más preferiblemente de 1 a 1000 nm, todavía más preferiblemente 1,5 a 100 nm, se inmoviliza sobre la superficie de estas aleaciones. 35

El procedimiento de inmovilizar ácido hialurónico sobre un dispositivo de implante según la invención proporciona la introducción de grupos funcionales amina en la superficie del dispositivo y el consecuente enlace de ácido hialurónico a dichos grupos amina mediante funcionalización de los grupos hidroxilo del ácido hialurónico. El ácido hialurónico es de hecho un mucopolisacárido de un peso molecular comprendido entre 50.000 y 8.000.000, en el que están presentes repeticiones de fórmula: 40



45 que contienen grupos alcohol primarios fácilmente funcionalizables.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es un dispositivo de implante que comprende un recubrimiento de sustrato que tiene grupos amina, en el que el ácido hialurónico está unido a dicho sustrato por funcionalización de grupos hidroxilo de dicho ácido hialurónico. 50

El sustrato que contiene los grupos amina puede colocarse en la superficie del dispositivo de implante según métodos ampliamente conocidos en el campo. La técnica que proporciona la introducción del sustrato que tiene grupos funcionales amina sobre la superficie del dispositivo de implante mediante deposición por plasma de moléculas que contienen grupos amina es particularmente ventajosa. Ejemplos típicos de moléculas que se usan para este propósito son alilamina, alquilamina tales como hexil- o heptilamina y, generalmente, las moléculas orgánicas con grupo funcional amina que tienen las características requeridas de volatilidad en la fase de plasma. La deposición por plasma de amina se lleva a cabo en las siguientes condiciones: presión comprendida entre 80 55

(10.6658 Pa) y 300 mTorr (39.9966 Pa), potencia de entrada comprendida entre 5 y 200 W, tiempo de deposición comprendido entre 1 ms y 300 s. La deposición por plasma puede también tener lugar en condiciones de plasma pulsado, con ciclos de plasma activo e inactivo comprendidos entre 1 y 100 ms, para minimizar la fragmentación molecular y mantener la mayor densidad posible de grupos amina. El tratamiento de deposición por plasma de amina puede ir precedido por otros tratamientos por plasma, por ejemplo plasma de oxígeno o aire para limpiar la superficie y aumentar la adhesión al sustrato.

El ácido hialurónico puede unirse a la capa de amina por disolución acuosa o de disolvente adecuado tal como dimetilsulfóxido o mezcla del mismo con agua, dimetilformamida o mezclas de la misma con agua, N-metilpirrolidona o mezclas de la misma con agua, por los métodos conocidos en la técnica para la funcionalización de grupos hidroxilo y particularmente para la sustitución de un grupo hidroxilo con un enlace de tipo amina:



en el que Ial es el residuo de ácido hialurónico y Sub es el residuo del sustrato que tiene funcionalidades amina. A partir de lo establecido anteriormente, se entiende que el procedimiento de la invención puede proporcionar la funcionalización de todos los grupos hidroxilo reactivos del ácido hialurónico así como sólo alguno de ellos, según la reacción que se emplea y las condiciones de reacción que se aplican en cada caso. Sin embargo, es necesario y suficiente que la reacción de funcionalización de los grupos hidroxilo del ácido hialurónico conduzca a la formación de una capa de ácido hialurónico que está unida con una cobertura fraccional, es decir la porción de superficie cubierta por ácido hialurónico, mayor de 0,6, tal como se evaluó mediante la espectroscopia fotoelectrónica por rayos X, conocida por el acrónimo XPS o ESCA. El método de ensayo se notifica en el artículo de Marco Morra y Clara Cassinelli: "Simple model for the XPS analysis of polysaccharide-coated surfaces", publicado en *Surface and Interface Analysis magazine*, 26, 742-746 (1998).

La reacción de funcionalización de los grupos hidroxilo del ácido hialurónico con la amina del sustrato puede llevarse a cabo según diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los siguientes (que se enumeran a modo de ejemplos no exhaustivos):

- activación del grupo hidroxilo por formación de mesilatos, tosilatos o grupos salientes similares, por ejemplo mediante reacción del ácido hialurónico con cloruro de tosilo o mesilo, y la posterior reacción de los grupos hidroxilo activados con la amina;
- sustitución del grupo hidroxilo con un halógeno, tal como cloro, bromo o yodo, por ejemplo mediante reacción del ácido hialurónico con cloruro de tionilo o tetrabromuro de carbono y trifenilfosfina, y una reacción posterior del ácido hialurónico halogenado con la amina;
- reacción de Mitsunobu del ácido hialurónico con amina, en presencia de azadicarboxilato de dietilo y trifenilfosfina;
- oxidación de grupos hidroxilo primarios a aldehídos y aminación reductora posterior.

Entre los métodos citados anteriormente, se prefiere la ruta de síntesis que proporciona la oxidación de grupos hidroxilo del ácido hialurónico a aldehídos y aminación reductora posterior del aldehído así formado.

La reacción de oxidación del grupo alcohol primario a aldehído puede llevarse a cabo usando cualquier agente de oxidación selectiva de un grupo alcohol, tal como trióxido de cromo o peryodato de potasio o sodio. El peryodato de sodio es el reactivo preferido en esta reacción.

Los grupos aldehído así formados reaccionan con los grupos amina de la alquil- o alilamina mediante aminación reductora en presencia de un agente reductor adecuado, tal como a modo de ejemplo no limitante: hidrógeno en presencia de un catalizador adecuado tal como níquel Raney o PtO₂; aluminio, amalgama de aluminio o Al/HgCl₂; boranos tales como decaborano; cianoborohidruro de sodio o un borohidruro inmovilizado sobre resina para síntesis en fase sólida, tal como MP-cianoborohidruro, MP-triacetoxiborohidruro en presencia de un eliminador adecuado tal como por ejemplo PS-isocianato, PS-benzaldehído o MP-TsOH.

Un reactivo preferido para la aminación reductora es cianoborohidruro de sodio.

Las condiciones de reacción empleadas para la oxidación del grupo hidroxilo a aldehído y para la aminación reductora del aldehído son las normalmente empleadas en este tipo de reacciones, tal como se ejemplifica en la sección experimental a continuación.

La ventaja de funcionalizar los grupos hidroxilo del ácido hialurónico en vez de los grupos carboxilo es que este método permite dejar los grupos carboxilo totalmente disponibles para su interacción con iones de calcio, maximizando de ese modo la actividad del ácido hialurónico de promoción de la mineralización ósea.

Según una realización preferida de la invención, además de la capa de ácido hialurónico unida, el dispositivo de implante puede comprender agentes bioactivos o fármacos liberables que son capaces de promover el crecimiento de tejido óseo. En esta realización, el dispositivo se recubrirá en primer lugar preferiblemente con una capa de cerámica o de polímero que es capaz de englobar, absorber o adsorber el fármaco o componente bioactivo, capa
5 sobre la que el ácido hialurónico se inmovilizará entonces según las técnicas descritas anteriormente.

Entre los fármacos o principios bioactivos que se emplean según la presente invención, están particularmente favorecidos aquellos que desempeñan un papel como estimuladores del crecimiento óseo. Entre ellos, el fármaco dexametasona, el fosfato de dexametasona o las formas solubles de acetato del mismo, la vitamina D en las
10 diversas formas de la misma, factores de crecimiento, la familia de proteínas conocida como las proteínas morfogénicas óseas, moléculas del tipo de polisacárido tales como heparina; sulfato de condroitina y ácido hialurónico se prefieren particularmente.

Aparte de la ausencia de toxicidad inherente, no hay límite químico para la naturaleza de la capa que engloba el fármaco o componente bioactivo, la composición de la mismo puede adaptarse a las características del fármaco o principio bioactivo y la liberación de cinética deseada. Ejemplos no exhaustivos son polímeros de silicona, olefina o de tipo acrílico tales polimetildisiloxano, polibutadieno, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poliuretanos, polímeros fluorados, poliésteres, acrilatos hidrófilos tales como poli(metacrilato de hidroxietilo) o poli(metacrilato de hidroxibutilo); la capa de cerámica opcional puede consistir en
20 cerámicas inertes basadas en aluminio, silicato, silicoaluminato, o cerámicas bioactivas tales como hidroxiapatita o fosfatos de calcio. Esta capa puede estar en forma o bien compacta o bien porosa, según lo que requiera el control cinético de la liberación.

Las capas de cerámica o de polímero pueden depositarse según las técnicas convencionales, por inmersión, pulverización tanto mediante pistola de pulverización convencional como por pulverización ultrasónica, por deposición por plasma o en fase de vapor. En el caso de las capas de cerámica, la técnica de sol-gel puede utilizarse también.
25

El fármaco o principio activo se depositará, englobará, absorberá o adsorberá en la capa de soporte según técnicas convencionales, tales como pulverización a partir de emulsiones, suspensiones, disoluciones comunes, o por procedimientos comunes de inmersión en emulsiones, suspensiones, disoluciones.
30

Según la presente invención, la capa que engloba el fármaco o principio activo se modificará a su vez por la deposición de un sustrato que porta grupos amina y enlace covalente posterior de ácido hialurónico a dicho sustrato, según el esquema descrito anteriormente. Por ejemplo, después de haber aplicado la capa que engloba el fármaco o principio activo, se lleva a cabo un procedimiento de deposición por plasma de alilamina o alquilamina, uniéndose entonces el ácido hialurónico en disolución acuosa al mismo. La liberación opcional y pérdida de fármaco en esta etapa se equilibrarán por una sobredosis medida inicial, englobando un exceso de fármaco o componente bioactivo en la matriz de cerámica o polímero. Este exceso será generalmente de hasta el 30% de la cantidad estequiométrica, más preferiblemente hasta el 10% de la cantidad estequiométrica.
35
40

Tal como se entenderá a partir de las pruebas experimentales notificadas a continuación en el presente documento, se ha encontrado de manera sorprendente que, al contrario de lo que se habría esperado según los datos de la bibliografía, el ácido hialurónico inmovilizado sobre un dispositivo de implante en el hueso lleva a cabo una marcada acción osteointegradora. Es por tanto un objeto adicional de la presente invención usar el ácido hialurónico para preparar un dispositivo de implante en contacto con el hueso, en el que dicho ácido hialurónico se inmoviliza en la superficie de dicho dispositivo de implante, tal como el agente promotor de la osteointegración.
45

Sección experimental

50 Ejemplo 1

Muestras de titanio con una capa de ácido hialurónico inmovilizado

Tres muestras de titanio al 99,7% (Sigma-Aldrich), en forma de cuadrados de 1 cm de lado, se someten a un procedimiento de deposición por plasma de alilamina, usando un reactor Gambetti Kenologia para tratamiento con plasma. Particularmente, el procedimiento de deposición se lleva a cabo por plasma pulsado, usando ciclos de 10 ms, a 100 mTorr (13,3322 Pa) de presión. La potencia de entrada es de 50 W, el tiempo de tratamiento es de 30 s. Al final del tratamiento, el tornillo se sumerge en una disolución de ácido hialurónico tratada previamente, a una concentración acuosa del 0,5%. El ácido hialurónico está fabricado por Lifecore Biomedical, Chaska, Minnesota, EE.UU. y se identifica por el n.º de lote B22157. La disolución acuosa de ácido hialurónico se había tratado previamente durante 16 horas en un tampón fosfato con peryodato de sodio (16 mg/100 cc) y se mezcló, tras la reacción, con un volumen igual de tampón acético que contenía 1 mg/cc de cianoborohidruro de sodio. Las muestras se mantienen en la disolución durante la noche, luego se lavan con agua y se secan bajo una campana de flujo laminar.
55
60
65

Ejemplo 2

Evaluación de la falta de adhesividad celular de las muestras

5 Las tres muestras del ejemplo 1, junto con tres muestras de tamaño similar de titanio sin modificar, se someten a pruebas de adhesión celular con células del tipo osteoblástico (MG-63), suministradas por el Instituto zooprofiláctico de Brescia. Las células, que se cultivan según los métodos tradicionales, se siembran en dos muestras modificadas con ácido hialurónico y dos controles que consisten en titanio sin modificar. Después de un cultivo de 3 días, las muestras se lavan delicadamente con tampón fosfato, las células adheridas se retiran con tripsina y se cuentan con un hemocitómetro. Se obtienen los siguientes resultados:

Muestra	Nº de células (media y desviación estándar)
Control	$3,4 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^5$
Recubierto con AH	$1,1 \times 10^3 \pm 0,8 \times 10^3$

15 Los datos confirman la reducción considerable del número de células presentes en la superficie modificada por ácido hialurónico, según los datos bibliográficos citados anteriormente.

Ejemplo 3

Tornillos de titanio con capa de ácido hialurónico inmovilizado

20 El experimento del ejemplo 1 se repite sobre un tornillo de implante de titanio fabricado por Agliati s.r.l. El tornillo se somete a prueba mediante espectroscopia fotoelectrónica por rayos X (XPS), una técnica de prueba de superficie capaz de proporcionar la composición química de una capa de superficie del material hasta aproximadamente 8 nm de profundidad. Se obtienen los siguientes resultados (los datos se expresan en % atómico):

C	O	N	Otro < 1%
70,5	18,1	10,1	Si, S, P

25 La estequiometría observada, particularmente la presencia de nitrógeno y las razones de C/O y C/N, concuerdan con la presencia de una capa de superficie fina de ácido hialurónico, tal como se espera por la tipología de la reacción de unión y según los datos bibliográficos.

Ejemplo 4

Confirmación in vivo de las características de osteointegración mejoradas

35 Para evaluar las características *in vivo* de los dispositivos implantables de titanio obtenidos según la invención, se llevan a cabo varios ensayos en conejos. Particularmente, se implantan tornillos de 2 mm de diámetro y 10 mm de longitud en el hueso cortical de la diáfisis femoral de 10 conejos adultos, para un total de 10 tornillos recubiertos y 10 controles sin recubrir. Los animales se sacrifican después de cuatro semanas y los fémures se preparan para examen histológico y pruebas mecánicas. Particularmente, los parámetros medidos son:

40 - el índice de afinidad, es decir la razón de longitud del hueso directamente opuesta a la superficie de contacto, sin la intervención de tejido fibroso, y la longitud total de la superficie de contacto, multiplicado por 100.

45 - el crecimiento del hueso, es decir la razón en porcentaje del área rellena de hueso y el área total contenida entre el tornillo y los vértices de una aguja, tal como se observa en la sección de examen histológico.

Además, mediante una máquina de prueba de extracción, se mide la fuerza máxima requerida para extraer el tornillo del hueso (fuerza de extracción).

50 Se obtienen los siguientes resultados:

Parámetro	Tornillo	
	Sin recubrir	Recubierto con ácido hialurónico
Índice de afinidad (%)	Media	69,7
	Desviación estándar	2,9

ES 2 730 213 T3

	(Mín.–Máx.)	(42,7 – 66,9)	(62,3 – 80,3)
Crecimiento óseo (%)	Media	84,5	91,0
	Desviación estándar	3,3	0,7
	(Mín.–Máx.)	(70,1 – 88,8)	(89,7 – 93,7)
Fuerza de extracción (N)	Media	185,3	232,2
	Desviación estándar	10,7	18,4
	(Mín.–Máx.)	(130,6 – 185,6)	(197,3 – 299,5)

5 Tanto los datos histomorfométricos como las pruebas mecánicas indican claramente que los tornillos recubiertos con ácido hialurónico, implantados en el hueso, no ejercen el efecto antiadherente y biopasivo tal como se habría esperado según el conocimiento actual de ácido hialurónico inmovilizado, sino que sorprendentemente tienen características de osteointegración mejoradas en comparación con los tornillos sin recubrir.

Ejemplo 5

10 *Tornillo de titanio con una capa para liberación de fármaco e inmovilización de ácido hialurónico sobre el mismo*

Varios tornillos de titanio se someten inicialmente a un procedimiento de deposición por plasma de propeno, usando el reactor descrito en el ejemplo 1. Posteriormente, los tornillos se recubren con una capa de polímero fina y con dexametasona, usando una pistola de pulverización (Conrad-Bartoli), cargada con la siguiente disolución:

15 el 0,5% de poli(metacrilato de butilo) y el 0,1% de dexametasona (ambos suministrados por Sigma Aldrich) en una mezcla 50-50 de acetona y alcohol metílico.

20 Los tornillos así obtenidos se someten al procedimiento descrito en los ejemplos 1 y 3, proporcionando de ese modo un tornillo de titanio que combina las características de liberación de un fármaco que promueve el crecimiento óseo y que tiene una superficie bioactiva recubierta con ácido hialurónico.

Ejemplo 6

25 *Liberación de dexametasona de un dispositivo de titanio con una capa inmovilizada de ácido hialurónico*

30 Un tornillo obtenido tal como se describió en el ejemplo 5 se sumerge en 2 cc de solución salina y se mantiene en una incubadora a 37°C. En determinados momentos, la disolución se saca y se mide el espectro de absorbancia UV-Vis a 242,4 nm, que es la longitud de onda de absorbancia máxima de la dexametasona. La curva de liberación se obtiene como una función del tiempo, tal como se muestra en la figura 1.

El dispositivo de implante de tejido óseo así obtenido es entonces capaz de acoplar la liberación de un fármaco que afecta al proceso de formación ósea con la bioactividad de la superficie recubierta con ácido hialurónico descrita anteriormente.

35 Entre las variables factibles que pueden proporcionarse para el dispositivo de implante sin apartarse del alcance de la presente invención, hay dispositivos de implante hechos de materiales diferentes de titanio, aleaciones del mismo o cromo-cobalto, tales como por ejemplo acero inoxidable común. Esto se permite por el efecto osteointegrador particular obtenible con los dispositivos de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de implante, de una naturaleza metálica o de polímero, que comprende un recubrimiento de un sustrato que tiene grupos amina, una capa de ácido hialurónico que se une químicamente sobre la superficie del mismo, en el que el ácido hialurónico se une a dicho sustrato por funcionalización de grupos hidroxilo de dicho ácido hialurónico para su uso en aplicaciones de contacto con el hueso, con una actividad estimuladora del crecimiento del tejido óseo.
2. Dispositivo de implante según la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo es un tornillo de implante dental, un tornillo de fijación esquelética o espinal, un disco intervertebral o una jaula.
3. Dispositivo de implante según la reivindicación 2, en el que dichos tornillos y dicha jaula están hechos de titanio o aleaciones del mismo.
4. Dispositivo de implante según la reivindicación 2, en el que dicho disco intervertebral está hecho de titanio, aleaciones del mismo o aleaciones de cromo-cobalto.
5. Dispositivo de implante según la reivindicación 4, en el que dicho sustrato que tiene grupos amina comprende unidades de alquilamina o alilamina, preferiblemente seleccionadas de hexil- o heptilamina.
6. Dispositivo de implante según la reivindicación 5, en el que la capa de dicho ácido hialurónico tiene un grosor comprendido entre 0,5 y 10000 nm.
7. Dispositivo de implante según la reivindicación 5, en el que la capa de dicho ácido hialurónico tiene un grosor comprendido entre 1 y 1000 nm.
8. Dispositivo de implante según la reivindicación 5, en el que la capa de dicho ácido hialurónico tiene un grosor comprendido entre 1,5 y 100 nm.
9. Dispositivo de implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la capa de dicho ácido hialurónico tiene una cobertura fraccional mayor de 0,6, evaluado mediante la técnica de espectroscopia fotoelectrónica por rayos X.
10. Dispositivo de implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo además dicho dispositivo agentes bioactivos o fármacos liberables que son capaces de promover el crecimiento de tejido óseo.
11. Dispositivo de implante según la reivindicación 10, en el que dichos fármacos o agentes bioactivos o bien se engloban, se absorben o bien se adsorben en una capa de cerámica o de polímero.
12. Dispositivo de implante según la reivindicación 11, en el que dicho sustrato sobre el que el ácido hialurónico se inmoviliza se deposita sobre dicha capa de cerámica o de polímero en la que dicho fármaco o componente bioactivo o bien se engloba, se absorbe o bien se adsorbe.
13. Dispositivo de implante según la reivindicación 10, en el que dicho fármaco o fármaco bioactivo se selecciona de dexametasona, el fosfato de dexametasona o las formas solubles de acetato del mismo, la vitamina D en las diversas formas de la misma, factores de crecimiento, la familia de proteínas conocida como proteínas morfogénicas óseas, moléculas del tipo de polisacárido tales como heparina; sulfato de condroitina y ácido hialurónico.
14. Dispositivo de implante según la reivindicación 11, en el que dicho sustrato de polímero comprende polímeros de silicona, olefina o de tipo acrílico, que se seleccionan preferiblemente de polimetildisiloxano, polibutadieno, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poliuretanos, polímeros fluorados, poliésteres, poliacrilatos hidrófilos preferiblemente seleccionados de poli(metacrilato de hidroxietilo) o poli(metacrilato de hidroxibutilo).
15. Dispositivo de implante según la reivindicación 11, en el que dicha capa de cerámica comprende cerámicas inertes basadas en aluminio, silicato, silicoaluminato, o cerámicas bioactivas tales como hidroxiapatita o fosfatos de calcio.
16. Dispositivo de implante según la reivindicación 15, en el que dicha capa de cerámica está en forma compacta o porosa.
17. Procedimiento para preparar un dispositivo de implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- proporcionar un dispositivo de implante metálico o de polímero;
 - recubrir la superficie de dicho dispositivo de implante con un sustrato que tiene grupos amina;
- 5
- unir ácido hialurónico a los grupos amina de dicho sustrato mediante funcionalización de grupos hidroxilo de dicho ácido hialurónico.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dicha etapa de recubrir la superficie de dicho dispositivo de implante con un sustrato que tiene grupos amina comprende las etapas de:
- 10
- seleccionar una amina que tiene características de volatilidad en fase de plasma;
 - depositar dicha amina en fase de plasma en la superficie de dicho dispositivo de implante tal como para crear una capa de sustrato que contiene grupos amina funcionalizables.
- 15
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicha deposición por plasma de amina se lleva a cabo en las siguientes condiciones: presión comprendida entre 80 (10,6658 Pa) y 300 mTorr (39,9966 Pa), potencia de entrada comprendida entre 5 y 200 W, tiempo de deposición comprendido entre 1 ms y 300 s.
- 20
20. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicha deposición por plasma de amina se lleva a cabo en condiciones de plasma pulsado, con ciclos de plasma activo e inactivo comprendidos entre 1 y 100 ms.
21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que dicho tratamiento de deposición por plasma de amina va precedido por tratamiento con plasma de oxígeno o aire para limpiar la superficie y aumentar la adhesión al sustrato.
- 25
22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que dicha amina se selecciona de alilamina, hexilamina y heptilamina.
- 30
23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en el que dicha etapa de unir ácido hialurónico a los grupos amina de dicho sustrato mediante funcionalización de grupos hidroxilo de dicho ácido hialurónico comprende las etapas de:
- oxidar selectivamente grupos alcohol del ácido hialurónico a grupos aldehído;
 - unir dichos grupos aldehído de ácido hialurónico a dichos grupos amina del sustrato mediante aminación reductora.
- 35
24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que dicha etapa de oxidación selectiva de grupos hidroxilo a grupos aldehído se lleva a cabo en presencia de peryodato de sodio.
- 40
25. Procedimiento según la reivindicación 23 ó 24, en el que dicha reacción de aminación reductora se lleva a cabo en presencia de cianoborohidruro de sodio.
- 45
26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en el que dicho ácido hialurónico se une mediante una disolución acuosa o disolución de disolvente adecuado tal como dimetilsulfóxido o mezclas del mismo con agua, dimetilformamida o mezclas de la misma con agua, N-metilpirrolidona o mezclas de la misma con agua.
- 50
27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, que comprende las etapas de:
- proporcionar un dispositivo de implante metálico o de polímero;
 - recubrir la superficie de dicho dispositivo de implante con una capa de cerámica o de polímero;
 - englobar, absorber o adsorber en dicha capa de cerámica o de polímero un componente bioactivo o fármaco liberable que es capaz de promover el crecimiento de tejido óseo;
 - depositar un sustrato que tiene grupos amina sobre dicha capa de cerámica o de polímero en la que dicho fármaco o compuesto bioactivo se engloba, absorbe o adsorbe;
 - unir ácido hialurónico a los grupos amina de dicho sustrato mediante funcionalización de grupos hidroxilo de dicho ácido hialurónico.
- 55
- 60
- 65
28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que dicha etapa de recubrir la superficie de dicho dispositivo de implante con una capa de cerámica o de polímero se lleva a cabo mediante inmersión, pulverización

tanto mediante pistola de pulverización convencional como por pulverización ultrasónica, por deposición por plasma o en fase de vapor o, en el caso de capas de cerámica, según la técnica de sol-gel.

- 5 29. Procedimiento según la reivindicación 27 ó 28, en el que dicho fármaco o principio bioactivo se engloba, absorbe o adsorbe en dicha capa de cerámica o de polímero mediante pulverización a partir de emulsiones, suspensiones, disoluciones comunes, o mediante procedimientos de inmersión en emulsiones, suspensiones, disoluciones comunes.
- 10 30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que dicha etapa de englobar, absorber o adsorber un fármaco o componente bioactivo en dicha capa de cerámica o de polímero se lleva a cabo en presencia de un exceso de fármaco o componente bioactivo de hasta el 30% de la cantidad estequiométrica, preferiblemente hasta el 10% de la cantidad estequiométrica.
- 15 31. Dispositivo de implante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, tal como puede obtenerse mediante el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 18 a 28.
- 20 32. Uso de ácido hialurónico para preparar un dispositivo de implante, estando dicho ácido hialurónico inmovilizado sobre el mismo, para promover la osteointegración de dicho dispositivo de implante en contacto con tejido óseo, en el que dicho dispositivo es tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

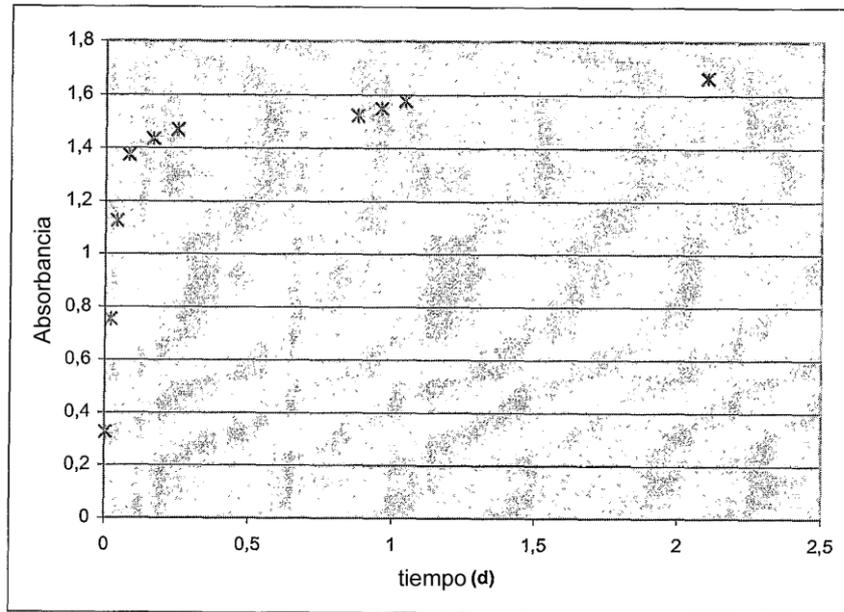


FIG. 1