(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 770 766**

(51) Int. CI.:

A61L 27/54 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61L 27/04 (2006.01)
A61L 27/06 (2006.01)
A61L 31/02 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2012 PCT/EP2012/076906**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13098295**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2012 E 12824796 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 2797642**

(54) Título: **Implante biocompatible**

(30) Prioridad:

26.12.2011 EP 11382404

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2020

(73) Titular/es:

NUMAT MEDTECH, S.L. (100.0%)
Parc Bit, Edificio Naorte, P4, Carretera de Valldemosa Km. 7
07121 Palma de Mallorca, Baleares, ES

(72) Inventor/es:

MONJO CABRER, MARTA;
PERELLÓ BESTARD, JOAN;
RAMIS MOREY, JOANA MARÍA;
TUR ESPINOSA, FERNANDO;
ARRIERO SÁNCHEZ, MARÍA DEL MAR;
MARTÍN BECERRA, EVA;
ISERN AMENGUAL, BERNAT y
HENRÍQUEZ PALÁEZ, RUBÉN

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Implante biocompatible

Ámbito de la invención

La presente invención corresponde al ámbito de los implantes biocompatibles, en particular, de los implantes biocompatibles que comprenden al menos un metal, como titanio, circonio, tantalio, hafnio, niobio, una aleación de cromo-vanadio y acero inoxidable, o bien una aleación de estos metales. De forma más específica, la presente invención hace referencia a implantes biocompatibles que comprenden al menos una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico que incluye un revestimiento que permite una oseointegración modulada o mejorada de dicho implante biocompatible cuando se implanta en el cuerpo de un mamífero.

Contexto de la invención

Los implantes médicos, como los implantes dentales, los implantes ortopédicos, las prótesis y los stents vasculares, normalmente están fabricados en titanio o una aleación de titanio. El titanio es el material empleado con mayor frecuencia como implante óseo, puesto que cuenta con unas destacadas propiedades físicas y biológicas, como una baja densidad, resistencia mecánica y resistencia química frente a los fluidos corporales. El titanio es un material biocompatible bien conocido, que se utiliza satisfactoriamente para la fabricación de prótesis e implantes dentales. La estructura y características químicas de su superficie son factores clave que rigen la integración ósea.

Los implantes dentales se utilizan en intervenciones de restauración dental en pacientes que han perdido una o varias de sus piezas dentales. Un implante dental consta de una fijación dental, que se utiliza como sustituto artificial de la raíz dental. Así pues, la fijación dental actúa como raíz de la nueva pieza dental. Por lo general, la fijación dental es un tornillo de titanio que cuenta con una superficie rugosa para así multiplicar el área en contacto con el tejido. El tornillo de titanio se implanta quirúrgicamente en la mandíbula, y tras esta implantación crece tejido óseo alrededor del citado tornillo. Este proceso se denomina oseointegración, porque proliferan osteoblastos sobre la superficie rugosa del tornillo implantado y en su interior. Por medio de la oseointegración, se consigue una instalación rígida del tornillo.

Una vez que el tornillo de titanio está firmemente anclado en la mandíbula, se puede prolongar mediante la fijación de un pilar al tornillo. Del mismo modo que el tornillo, el pilar puede estar fabricado en titanio o una aleación de titanio. La forma y tamaño del pilar utilizado se ajustan de tal modo que este componente sobresale con precisión de la encía tras su fijación en el tornillo. Después, se puede fijar al pilar un dispositivo de restauración dental, como una corona, puente o prótesis dental. Como alternativa, el tornillo de titanio presenta una forma y tamaño tales que, tras la implantación, sobresale de la encía, de modo que no se requiere de ningún pilar, y se puede fijar directamente al tornillo un dispositivo de restauración dental, como una corona, puente o prótesis dental.

Los implantes ortopédicos se utilizan para la conservación y restauración funcional del sistema musculoesquelético, en particular de articulaciones y huesos, incluido el alivio de dolor en estas estructuras. Los stents vasculares son implantes tubulares preparados para su inserción en vasos sanguíneos para impedir o contrarrestar una oclusión localizada del flujo sanguíneo, esto es, evitan reducciones significativas del diámetro de un vaso sanguíneo.

Como se ha mencionado con anterioridad, el titanio (Ti) se utiliza habitualmente en aplicaciones odontológicas y ortopédicas, así como en stents vasculares. Se ha descrito que la excelente biocompatibilidad del titanio se debe a los óxidos estables que rápidamente se forman sobre las superficies de este elemento. Sin embargo, también se ha descrito que la respuesta ósea a las superficies del implante depende de las propiedades químicas y físicas de las superficies de titanio, lo que afecta a la viabilidad del implante. Así pues, la atención se ha centrado en la preparación de la superficie de los implantes de titanio.

Puesto que la superficie del titanio y sus aleaciones es bioinerte, se puede formar tejido fibroso de un grosor variable que encapsula y aísla los implantes del entorno circundante cuando estos se utilizan para fines de oseointegración. Para hacer frente a esta falta de oseointegración se recurre a la modificación de la superficie del implante mediante la adición de revestimientos bioactivos. La investigación actual relativa a la modificación de la superficie de los implantes se centra en la conversión de los materiales prácticamente bioinertes en materiales bioactivos o, más bien, en influir en los tipos de proteínas que absorbe la superficie inmediatamente después de la implantación. El abanico de modificaciones de la superficie va desde los revestimientos no biológicos, como carburos, flúor, calcio, hidroxiapatita o fosfato cálcico, hasta los revestimientos que imitan la envolvente biológica mediante monocapas o bicapas lipídicas, factores de crecimiento, proteínas o péptidos.

Se ha propuesto que la biocompatibilidad de las prótesis o implantes puede potenciarse mediante la fijación o integración de diversas biomoléculas activas a la superficie de la prótesis, por ejemplo, a la superficie metálica de una prótesis de titanio. En el caso de los implantes preparados de este modo, se han tratado de conseguir los objetivos siguientes: mejor encaje; mayor adherencia del tejido y mayor compatibilidad hística; presencia de una

superficie biológicamente activa para lograr una mayor proliferación, diferenciación y maduración celulares; menor inmunorreactividad; actividad antimicrobiana; mayor capacidad de biomineralización; mayor capacidad de cicatrización o consolidación ósea; capacidad para conseguir una mayor densidad ósea; menor "tiempo de espera para la carga" y menor inflamación.

Se han aplicado diversos métodos de modificación mecánica, química y física de la superficie de aleaciones de titanio, como mecanizado o pulido, tratamiento ácido o alcalino, oxidación anódica, deposición química en fase vapor, modificación bioquímica mediante silanización, deposición física en fase vapor, implantación de iones y tratamiento con plasma de descarga incandescente. Para aplicaciones biológicas, el tratamiento con plasma mediante descarga incandescente por radiofrecuencia (RFGD) es especialmente atractivo, puesto que se puede utilizar para formar depósitos de grupos funcionales activos para el enlace covalente de otros polímeros o biomoléculas. De forma similar, se han utilizado agentes de acoplamiento de silano con un grupo funcional terminal para la modificación de la superficie de sílices inorgánicas, así como de materiales metálicos. En otros estudios se ha descrito la modificación de superficies de titanio mediante alquilosilanos para formar películas orgánicas con una buena estabilidad y, asimismo, se han aplicado agentes de acoplamiento como trialcoxisilanos organofuncionales para formar un enlace químico duradero entre moléculas inorgánicas y orgánicas (o fracciones) (Liu, Chu et al. 2004).

Sin embargo, jamás se ha descrito el enlace covalente de inositol fosfatos (IP) con una superficie metálica, directamente o bien mediante un ligador.

El mioinositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato (IP6), también conocido como ácido fítico o fitato (cuando se presenta en forma de sal), es una molécula abundante en semillas vegetales y legumbres. También se encuentra presente de forma natural en los fluidos biológicos de todos los mamíferos (como orina y plasma) a causa de su administración exógena, principalmente a través de su ingestión alimentaria. Recientemente se han puesto de manifiesto diversos efectos beneficiosos potenciales de este compuesto en la salud humana. En particular, la función del IP6 como inhibidor de la resorción ósea en modelos con animales de osteoporosis. Se adsorbe en la superficie de la hidroxiapatita (HAP), el mineral constituyente del hueso, lo que reduce la pérdida progresiva de masa ósea y actúa como un potente inhibidor de la disolución de la hidroxiapatita.

La estructura de los IP y su afinidad por los iones de calcio les confiere propiedades de inhibición de la cristalización, además de propiedades antirresorción (Grases, Sanchis et al. 2010).

El fitato se ha descrito con anterioridad en el contexto de implantes médicos biocompatibles, como por ejemplo en la patente WO2004/024202, en la que se presentan implantes biocompatibles con un revestimiento de un óxido metálico que contiene fósforo formado mediante un tratamiento anódico. El revestimiento se añade al implante para facilitar su fijación al tejido óseo.

Asimismo, en la patente US 5,478,237, similar a la WO 2004/024202, los implantes también se fabrican mediante tratamiento anódico. Los revestimientos de los implantes presentados incluyen, además, iones de calcio y fósforo para mejorar la formación de hueso en el implante descrito en dicha patente.

Sin embargo, el tratamiento anódico no produce el enlace covalente de las biomoléculas, sino que implica la formación de una capa de película adsorbida que contiene oxígeno y las biomoléculas (con calcio y fósforo, por ejemplo) sobre la superficie metálica.

A pesar de la disponibilidad de implantes biocompatibles en la técnica actual, todavía se deben identificar implantes biocompatibles alternativos que, además, puedan facilitar la oseointegración de un implante cuando se introduzca en el organismo de un mamífero. Por tanto, uno de los objetivos de la presente invención consiste en superar algunos de los problemas asociados a los implantes de la técnica anterior, principalmente relacionados con las dificultades para fijar de forma permanente moléculas bioactivas a la superficie de un implante. Además, la mayoría de técnicas disponibles presentan una limitación relativa a la absorción física (unión lábil) de estos compuestos sobre la superficie del implante.

Resumen de la invención

Las dificultades descritas con anterioridad se han, como mínimo, mitigado mediante un implante biocompatible que cuenta con uno o varios metales, aleaciones metálicas, óxidos metálicos o una combinación de estos elementos, en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un inositol fosfato (IP), un ester de un IP o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible. La invención también hace referencia a un implante biocompatible que incorpora titanio o una aleación de titanio, en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un inositol fosfato (IP), un ester de un IP o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y por

lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible.

Por tanto, los presentes inventores han descubierto que, al formar un enlace covalente entre un IP, un ester de un IP o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico, como una superficie de titanio o de una aleación de titanio, de un implante biocompatible, se potencian enormemente las propiedades de oseointegración del implante. Hasta la fecha no se conoce ni se infiere ningún implante biocompatible de este tipo en este ámbito.

La presente invención también hace referencia a un implante biocompatible en el que se utiliza un ligador, como un ligador de silicio, para formar un enlace covalente entre la superficie del implante y el citado IP, ester de un IP o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias. En este aspecto, una parte de dicho ligador se une a la citada superficie, y otra parte del ligador se une al citado IP, ester de un IP o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, de modo que se forma un enlace covalente entre el IP y la superficie. El enlace entre el ligador y dicha superficie y el citado IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, se realiza mediante reacciones químicas que se producen entre el ligador y el IP, de modo que se garantiza un enlace covalente entre la superficie y el citado IP o ester de IP. En la figura 1 o 2 se muestra un proceso de este tipo.

La presente invención también hace referencia a un método para la fabricación de un implante biocompatible que incluye la adición de un IP, un ester de un IP o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, a una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de dicho implante biocompatible, método que, opcionalmente, puede incluir el pretratamiento químico del citado implante biocompatible antes de la adición de un IP, ester de un fitato o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, al citado implante pretratado químicamente. Dicho método también comprende un paso en el que se añada un ligador, como un ligador de silicio, opcionalmente después del pretratamiento químico de dicho implante y antes de la adición del citado IP al implante biocompatible.

En las siguientes cláusulas se describen otros aspectos y otras formas de realización de la presente invención:

Cláusula 1. Un implante biocompatible que cuenta con uno o varios metales, aleaciones metálicas, óxidos metálicos o una combinación de estos elementos, en el que se forma un enlace/s covalente/s, con un ligador, entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible.

Cláusula 2. Un implante biocompatible de conformidad con la cláusula 1, en el que el IP incluye 1, 2, 3, 4, 5 o 6 grupos fosfato, como inositol hexafosfato (IP6).

Cláusula 3. Un implante biocompatible de conformidad con la cláusula 1, en el que se forma un enlace covalente entre por lo menos el 50% del peso del citado IP, ester de IP y/o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, presente en la citada superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de dicho implante biocompatible y la citada superficie.

Cláusula 4. Un implante biocompatible de conformidad con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que se forma un enlace covalente entre por lo menos el 60% del citado IP, éster de IP y/o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, presente en la citada superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de dicho implante biocompatible y la citada superficie, como por ejemplo como mínimo el 70% u 80%.

Cláusula 5. Un implante biocompatible de conformidad con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que se une un ligador a dicha superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico y al citado IP, ester de un IP y/o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias.

Cláusula 6. Un implante biocompatible de conformidad con la cláusula 5, en el que el citado ligador se selecciona del grupo formado por anhídridos, alcoholes, ácidos, aminas, epoxis, isocianatos, silanos, grupos halogenados y grupos polimerizables, preferiblemente 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES).

Cláusula 7. Un implante biocompatible de conformidad con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que los citados metales, aleaciones metálicas, óxidos metálicos o combinación de estos elementos se seleccionan del grupo formado por titanio, una aleación o un óxido de este elemento; circonio, una aleación o un óxido de este elemento;

tantalio, una aleación o un óxido de este elemento; hafnio, una aleación o un óxido de este elemento; niobio, una aleación o un óxido de este elemento; una aleación de cromo-vanadio o un óxido combinado y acero inoxidable, preferiblemente titanio, óxido de titanio o una aleación de este elemento.

Cláusula 8. Un implante biocompatible de conformidad con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el implante se selecciona del grupo formado por un implante quirúrgico, un implante ortopédico, un implante dental, un dispositivo de fijación ortopédico, una prótesis ortopédica articular, un disco protésico para fijación vertebral y un metal. Dicho implante también puede ser un material metálico de injerto, preferiblemente un andamiaje de óxido metálico que consta de óxido de titanio.

Cláusula 9. Un implante biocompatible de conformidad con cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que otras biomoléculas están presentes en una superficie metálica o de una aleación metálica del implante, y las citadas biomoléculas se seleccionan del grupo formado por biomoléculas naturales, biomoléculas sintéticas y biomoléculas recombinantes, como bioadhesivos, factores de adhesión celular, biopolímeros, proteínas sanguíneas, enzimas, biomoléculas y proteínas de la matriz extracelular, hormonas y factores de crecimiento, ácidos nucleicos (DNA y RNA), receptores, biomoléculas sintéticas, vitaminas, fármacos, bifosfonatos, iones biológicamente activos, fluoruro y biomoléculas marcadoras.

Cláusula 10. Un método de fabricación de un implante biocompatible de conformidad con cualquiera de las cláusulas anteriores, que incluye la entrada en contacto y la reacción de un IP, un ester de un IP o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, con la superficie de dicho implante biocompatible.

Dicho método además comprende los pasos siguientes:

a) Pretratamiento químico de la superficie de un implante.
b) Entrada en contacto y reacción de un IP, un ester de un IP o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, con dicha superficie pretratada químicamente, en el que antes del paso b), se lleva a cabo un paso que consiste en la entrada en contacto y reacción de un ligador con la superficie pretratada químicamente obtenida en el paso a), y en el que en el paso b) el IP reacciona con el citado ligador.

Cláusula 11. Un método de conformidad con la cláusula 10, en el que el paso a) se realiza mediante un tratamiento de pasivación, un tratamiento con solución piraña o un tratamiento con una o varias soluciones alcalinas.

Cláusula 12. Un método de conformidad con cualquiera de las cláusulas de la 10-11, en el que el citado IP, ester de IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, se activa antes de su adición a la superficie en el paso b).

Cláusula 13. Un método de conformidad con la cláusula 12, en el que dicha activación se realiza mediante la adición de un reticulante de carbodiimida, como N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), al citado IP, ester de IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias.

Cláusula 14. Un método de conformidad con la cláusula 12-13, en el que la activación incluye la formación de un fosforamidato.

Cláusula 15. Un método de conformidad con la cláusula 14, en el que la formación de un fosforamidato consta de los pasos siguientes:
a) Adición de hidrocloruro de 1-etil-3-3-dimetilaminopropilcarbodiimida al citado fitato inositol fosfato, ester de un inositol fosfato fitato, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, para la formación de un ester activo.
b) Posteriormente, adición de imidazol al citado ester activo para la formación de un fosforamidato activo.

Cláusula 16. Un implante biocompatible que se puede obtener a través de un método de conformidad con cualquiera de las cláusulas de la 10 a la 15.

Cláusula 17. Uso de un implante biocompatible de conformidad con cualquiera de las cláusulas de la 1 a la 9 y la 16 para su uso en la modulación o mejora de la oseointegración.

Cláusula 18. Un implante biocompatible de conformidad con cualquiera de las cláusulas de la 1 a la 9 y la 16 para su uso en medicina regenerativa, preferiblemente para sustituir tejido óseo o restaurar una función corporal de un animal vertebrado, en particular de un mamífero, como por ejemplo un humano.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Imagen esquemática que describe la adición de una biomolécula sobre una superficie metálica sin (a) o con (b) un ligador.

Figura 2. (a) Reacción de la superficie de TiO_2 con APTES. (b) Activación del IP6 con el reticulante de carbodiimida (EDC) e imidazol, y posterior fijación de la biomolécula a la superficie de titanio (nota: sólo se muestra la activación de un grupo fosfato).

Figura 3. Análisis mediante EDS de las superficies de titanio tras el enlace covalente de IP6 con un ligador.

Figura 4. Caracterización de las superficies de titanio tras la adsorción física de IP6 (a) Análisis mediante EDS de muestras no enjuagadas. (b) Análisis mediante EDS de muestras enjuagadas.

Figura 5. Análisis mediante EDS de superficies de titanio tras el enlace covalente de IP6 con un ligador (a) no pretratadas químicamente; (b) tras el pretratamiento de pasivación; (c) tras el pretratamiento con solución piraña; (d) tras el pretratamiento con solución alcalina.

Figura 6. Efecto del IP6 en la viabilidad celular y proliferación de células progenitoras de osteoclastos. (A) Actividad de la LDH medida en el medio de cultivo recogido tras el tratamiento de células con dosis distintas de IP6 durante 24 horas. El control positivo alto (100%) correspondió al medio de cultivo de células incubadas con Triton X-100 al 1%. El control negativo bajo (0%) correspondió al medio de cultivo de células de control. Los valores representan la media ± EEM. Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de Mann-Whitney: * $p \leq 0,05$ frente a las células no tratadas. (B) Proliferación de células RAW 264.7 tratadas con dosis diferentes de IP6 durante 24 horas y marcadas con BrdU durante seis horas. Los valores se expresan como porcentaje de las células de control, que se fijaron en el 100%. Los valores representan la media ± EEM. Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de la t de Student.

Figura 7. El IP6 inhibe directamente la formación de osteoclastos inducida por RANKL. (A) Efecto del tratamiento con IP6 en la generación de células multinucleadas positivas para TRAP (OCL). Células RAW 264.7 cultivadas durante cinco días sin estimulación con RANKL (izquierda). Células RAW 264.7 a las que se han dosificado 100 ng/mL de RANKL durante cinco días (centro). Células RAW 264.7 a las que se han dosificado 100 ng/mL de RANKL y que se han tratado con 1 µM de IP6 durante cinco días (derecha). Se muestran imágenes representativas. (B) Número de células multinucleadas positivas para TRAP (OCL) generadas a partir de RAW264.7 tratadas con IP6. Los valores se expresan como porcentaje de las células a las que se ha dosificado RANKL no tratadas con IP6, que se fijaron en el 100%.

Figura 8. El IP6 inhibe directamente la formación de osteoclastos inducida por RANKL. (A) Niveles de mRNA de TRAP, (C) niveles de mRNA de CFMS y (B) niveles de mRNA de CalcR de células estimuladas con RANKL y tratadas con IP6. Los datos representan cambios de pliegue de genes diana normalizados con mRNA de GAPDH y rRNA 18s, expresado como porcentaje de las células a las que se ha dosificado RANKL no tratadas con IP6, que se fijaron en el 100%. Los valores representan la media ± EEM. Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de la t de Student: * $p \leq 0,05$ frente a las células de control. # $p \leq 0,05$ frente a las células tratadas con RANKL.

Figura 9. El IP6 inhibe directamente la capacidad de resorción ósea de osteoclastos inducida por RANKL. Las células RAW 264.7 se trataron con RANKL (100 ng/ml) durante la generación de OCL y con IP6 durante cinco días y se determinó la expresión génica de marcadores funcionales de osteoclastos: Car-2(A), ATPasa H+ (B), CtsK (C) y MMP-9 (D). Los datos representan cambios de pliegue de genes diana normalizados con mRNA de GAPDH y rRNA 18s, expresado como porcentaje de las células a las que se ha dosificado RANKL no tratadas con IP6, que se fijaron en el 100%. Los valores representan la media ± EEM. Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de la t de Student: * $p \leq 0,05$ frente a las células de control. # $p \leq 0,05$ frente a las células tratadas con RANKL.

Figura 10. El IP6 inhibe directamente la capacidad de resorción ósea de osteoclastos inducida por RANKL. (A) La capacidad de resorción ósea de las células RAW 264.7 tratadas con 1 µM de IP6 durante la osteoclastogénesis se evaluó mediante un ensayo de cavidad de resorción en discos de dentina (n=3). Los datos representan el porcentaje del área resorbida por los osteoclastos. Los valores representan la media ± EEM. Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de la t de Student: * $p \leq 0,05$ frente a las células de control. # $p \leq 0,05$ frente a las células tratadas con RANKL. (B) La formación de un anillo de actina de osteoclastos maduros tratados con 1 µM de IP6 durante 24 horas se evaluó mediante microscopía confocal. Se aplicó la tinción FITC-faloidina (verde) a la actina y la tinción DAPI (azul) a los núcleos. Se muestran imágenes representativas.

Figura 11. El IP6 induce la diferenciación de osteoblastos de hUC-MSC. Las células hUC-MSC se trataron con 4 µM de IP6 durante 19 días, y se determinó la expresión génica de marcadores de osteoblastos: Runx-2(A), Col1A (B), ALP (C) y OC (D). Los datos representan cambios de pliegue de genes diana normalizados con mRNA de GAPDH y mRNA de beta-actina, expresados como porcentaje de las células de control, que se fijaron en el 100%. Los valores representan la media ± EEM. Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de la t de Student.

Figura 12. Toxicidad de las modificaciones de la superficie respecto a los implantes de titanio de control no tratados (toxicidad del 0%) y con Triton X-100 al 0,1% (toxicidad del 100%) medida según el nivel de LDH en las respectivas superficies. Se probaron tres tipos de implantes en forma de moneda de titanio: monedas de titanio de control, monedas de titanio pretratadas (pasivadas) y ligadas con APTES, y monedas de titanio pretratadas (pasivadas) y ligadas con APTES e IP6. Los valores representan la media ± EEM. Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de la t de Student: * $p \leq 0,05$ frente al titanio de control.

Figura 13. El enlace covalente entre ácido fítico y los implantes de titanio induce la expresión génica de la osteocalcina en las células MC3T3-E1. Los datos representan cambios de pliegue de osteocalcina normalizados, expresados como porcentaje de las células cultivadas en implantes de titanio de control, que se fijaron en el 100%. Los valores representan la media ± EEM. Las diferencias significativas se evaluaron con la prueba de la t de Student.

Descripción detallada de la invención

En consecuencia, la presente invención hace referencia a un implante biocompatible que proporciona propiedades de oseointegración moduladas, preferiblemente mejoradas, a causa de las características físicas de una capa superficial metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico, o bien de una combinación de las citadas sustancias, que incluye un IP unido a dicha superficie. Para preparar una capa superficial con estas ventajas se ha formado un enlace covalente entre un IP y una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico, como una superficie de titanio, de una aleación de titanio o de un óxido de titanio del citado implante, de modo que se obtiene una superficie que es adecuada para la oseointegración.

Así pues, en un aspecto, se proporciona un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas u óxidos metálicos en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible. La invención también incluye un implante biocompatible que incorpora titanio, una aleación de titanio o un óxido de titanio, en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y por lo menos una parte de la citada superficie de titanio, de una aleación de titanio o de un óxido de titanio del citado implante biocompatible.

Con anterioridad se ha utilizado inositol hexafosfato para implantes, pero los métodos de unión de este elemento se centraban principalmente en la absorción fisicoquímica, que se caracteriza por ser una interacción lábil. Esta se puede eliminar fácilmente mediante un simple enjuagado (por ejemplo, véase la figura 4). Los presentes inventores han logrado superar estos obstáculos, ya que han conseguido fabricar un implante que cuenta con IP fijado de forma covalente.

El enlace covalente se forma entre una superficie metálica, de una aleación metálica y/o de un óxido metálico de un implante de conformidad con la invención, como una superficie de titanio, de una aleación de titanio o de un óxido de titanio de un implante, y un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias. Un enlace covalente de este tipo se puede conseguir, por ejemplo, mediante un ligador, como un ligador de silicio, como por ejemplo APTES ((3-aminopropil) trietoxisilano), al situar dicho ligador entre la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico y el IP, ester de un IP y/o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, de modo que se forma un complejo de tres partes entre el citado metal, aleación metálica u óxido metálico, el ligador y el IP (véase la figura 2).

En consecuencia, dicho IP, ester o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico y, opcionalmente, el citado ligador, pueden formar un revestimiento covalente sobre la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible. Así pues, en el presente documento también se presenta un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas u óxidos metálicos en el que por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible incorpora un revestimiento de un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y un ligador, como un ligador de silicio, como por ejemplo (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES).

Los grupos de fosfato orgánico (por ejemplo, de oligonucleótidos) también se pueden conjugar con aminas primarias mediante N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) como reticulante. Por tanto, el IP se puede obtener de grupos fosfato mediante su conjugación con aminas primarias a través de un producto intermedio reactivo de fosforilimidazolina, que puede estimular el enlace covalente con la superficie de titanio aminosiloxano.

Para crear un enlace covalente entre un compuesto y una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico, se puede utilizar una luz UV de alta energía que genere grupos reactivos sobre el titanio, y también puntos de enlace reactivos en las moléculas que deben revestir la superficie en un único paso (Petzold, Lyngstadaas et al. 2008). La luz UV de alta energía afecta a los estados de enlace entre los átomos de las moléculas. En un entorno con condiciones ambientales, la energía se transfiere a moléculas que reaccionan con las moléculas de oxígeno, moléculas que son muy susceptibles a la excitación. Este proceso se denomina fotooxidación. El TiO_2 es un fotocatalizador bien conocido (Nakamura, Sirghi et al. 2002; Wu, Wang et al. 2006); se generan pares electrón-hueco, se liberan compuestos reactivos de oxígeno, y las moléculas de agua se disocian y adsorben en la superficie si se irradian con luz UV (Mills and LeHunte 1997; Wang, Hashimoto et al. 1998; Miyauchi, Kieda et al. 2002) . Al mismo tiempo, la luz UV oxida las biomoléculas, lo que aumenta su reactividad y permite la formación de enlaces covalentes con la superficie de TiO_2 fotooxidada.

Un "implante", como el que se cita en el presente documento, se puede describir como un material sintético o natural utilizado para reemplazar una parte de un sistema vivo o para funcionar en estrecho contacto con tejido vivo. Por tanto, un "implante biocompatible" se puede describir como un implante que no provoca reacciones corporales adversas significativas cuando se implanta en el cuerpo de un mamífero, como por ejemplo cualquier reacción significativa del sistema inmunitario. En consecuencia, dicho implante está diseñado para interactuar con el cuerpo del mamífero y facilitar su implantación.

El término "oseointegración" en el sentido en el que se menciona en el presente documento hace referencia a una característica de un implante de conformidad con la invención relativa a la conexión directa estructural y funcional entre hueso vivo y la superficie de dicho implante sin crecimiento de tejido fibroso en la superficie de contacto entre hueso e implante y sobre dicha superficie. No basta con potenciar el crecimiento óseo en las proximidades del implante, si no existe una conexión directa entre el implante y el hueso nuevo. Así pues, se puede incrementar el crecimiento óseo sin modular las propiedades de oseointegración del implante, lo que no se traducirá en una sólida superficie de contacto entre hueso e implante que resista una ruptura mecánica, sino que conducirá a la formación de tejido blando y no hueso en la superficie de contacto a causa del movimiento del implante en dicha superficie de contacto. El implante biocompatible de la presente invención permite la modulación de la oseointegración. Esto supone la ventaja de que determinados implantes pueden ser temporales y, por tanto, no es deseable que el implante esté conectado con el hueso, mientras que otros pueden ser permanentes, para los que se trata de conseguir una mejor oseointegración.

A modo de ejemplo, un implante está "oseointegrado" si la superficie de contacto entre hueso e implante presenta diversas características: (1) buena estabilidad mecánica evaluada por pruebas biomecánicas, como un ensayo de adherencia por tracción, (2) ausencia de reacción inflamatoria y necrosis de tejido, (3) hueso periimplante con una matriz ósea muy mineralizada, caracterizada por análisis microcomputadorizado, y un nivel bajo de proteínas, (4) colonización de la superficie del implante por parte de células del linaje osteoblástico, basada en la expresión génica de diversos marcadores moleculares.

Un enlace "covalente" es una forma de enlace químico que se caracteriza por la compartición de pares de electrones entre átomos, en comparación con los enlaces iónicos en los que los átomos están enlazados entre sí a causa de la atracción ejercida entre iones con cargas opuestas. La fuerza de un enlace covalente depende de la relación angular entre átomos de las moléculas poliatómicas. La presente invención se centra principalmente, aunque no de forma exclusiva, en enlaces covalentes simples entre átomos de oxígeno de la superficie oxidada del metal y la biomolécula activa o enlaces covalentes simples entre átomos de oxígeno de la superficie oxidada del metal y un ligador, además de enlaces covalentes simples entre el ligador y la biomolécula activa. La hibridación del átomo central del enlace puede ser sp3 (definición basada en la teoría del enlace de valencia). Por lo general, la energía de los enlaces covalentes puede ser superior a aproximadamente 30 kJ/mol, preferiblemente superior a aproximadamente 100 kJ/mol y, de forma todavía más preferible, superior a aproximadamente 150 kJ/mol.

En el presente contexto, el alcance del término "implante" incluye cualquier dispositivo destinado a implantarse en el organismo de un animal vertebrado, en particular un mamífero, como por ejemplo un humano. Algunos ejemplos, sin que ello suponga ningún tipo de limitación, de este tipo de dispositivos son los dispositivos médicos que sustituyen un componente anatómico o restauran una función corporal, como la articulación coxofemoral; la cabeza femoral; el cotilo; stents vasculares; el codo, incluidos vástagos, cuñas e insertos articulares; la rodilla, incluidos los componentes femoral y tibial, vástagos, cuñas, insertos articulares o componentes rotulianos; el hombro, incluido el vástago y la cabeza; la muñeca; el tobillo; la mano; dedos de la mano; dedos del pie; vértebras; discos vertebrales; prótesis articulares; implantes dentales; implantes de huesecillos; implantes del oído medio, incluidos el yunque, el martillo, el estribo y las combinaciones yunque-estribo, martillo-yunque, martillo-yunque-estribo; implantes cocleares; dispositivos de fijación ortopédica como clavos, tornillos, grapas y placas; válvulas cardíacas; marcapasos; catéteres; vasos; implantes expansivos; implantes para la retención de ayudas auditivas; implantes de fijación externa; discos protésicos para fijación vertebral y también dispositivos intrauterinos (DIU), así como dispositivos bioelectrónicos, como dispositivos electrónicos intracocleares o intracraneales. También se incluyen los implantes quirúrgicos.

Los implantes médicos también se pueden considerar implantes o dispositivos médicos protésicos. Por lo general, un implante médico está formado por una o varias piezas de implante. En consecuencia, la presente invención también hace referencia a uno o varios componentes o piezas de implante biocompatible, que incluyen uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos.

En el presente contexto, el alcance del término "implante ortopédico" incluye cualquier dispositivo destinado a implantarse en el organismo de un animal vertebrado, en particular un mamífero, como por ejemplo un humano, para la conservación y restauración funcional del sistema musculoesquelético, en particular de articulaciones y huesos, incluido el alivio de dolor en estas estructuras. En este contexto, también se prevén los dispositivos de fijación ortopédicos y las prótesis ortopédicas articulares.

En el presente contexto, el alcance del término "implante dental" incluye cualquier dispositivo destinado a implantarse en la cavidad bucal de un animal vertebrado, en particular un mamífero, como por ejemplo un humano, en intervenciones de restauración dental. Los implantes dentales también se pueden considerar dispositivos protésicos dentales. Por lo general, un implante dental está formado por una o varias piezas de implante. Por ejemplo, un implante dental suele incluir una fijación dental unida a piezas secundarias del implante, como un pilar o un dispositivo de restauración dental, como por ejemplo una corona, puente o prótesis dental. Sin embargo, cualquier dispositivo destinado a implantarse, como una fijación dental, sólo puede denominarse implante incluso aunque se deban conectar a él otras piezas.

En el contexto de la presente invención, los términos "implante", "implante médico", "material de injerto", "dispositivo" y "dispositivo médico" se pueden utilizar indistintamente en este documento. Es importante comprender que, en lo relativo a todos los aspectos de la presente invención, siempre que en este documento se haga referencia a un "implante biocompatible" o a un "implante", esto incluye cualquiera de los implantes citados en este documento o que una persona versada en la materia sepa que son adecuados para la presente finalidad.

El hueso es un órgano multifuncional formado por un marco estructural de matriz mineralizada y que contiene poblaciones heterogéneas de condrocitos, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos, linfocitos y células hemopoiéticas. El crecimiento óseo está regulado por interacciones complejas entre diversos actores intercelulares y extracelulares. En general, el tejido mineralizado es vital para muchos fenotipos adaptativos característicos de los vertebrados. El tejido duro o mineralizado incluye tanto múltiples tipos diferentes de tejido que se dan de forma natural y que se han mineralizado como tejido que cuenta con sustancia intercelular dura.

Cuando se hace referencia a un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, esto también puede incluir un implante que incluya uno o varios materiales biocompatibles adicionales, como materiales sintéticos o plásticos. Como alternativa, un implante biocompatible también puede estar formado casi íntegramente, o completamente, por un metal, aleación metálica u óxido metálico, como titanio, una aleación de titanio y/o un óxido de titanio. En algún aspecto, dicho implante puede tener una superficie metálica, de una aleación metálica y/o de un óxido metálico, y el núcleo puede estar formado por otros materiales adecuados para la presente finalidad. La superficie metálica, de una aleación metálica y/o de un óxido metálico se puede añadir sobre un implante cuando el implante *per se* está fabricado en otro material o cuando el implante está fabricado parcialmente de metal, de una aleación metálica y/o de un óxido metálico. Todo esto recibe la denominación de implante que incluye un metal, una aleación metálica y/o un óxido metálico.

Dicho implante biocompatible también puede incluir más de un metal, aleación metálica y/u óxido metálico, como por ejemplo titanio, una aleación de titanio y/o un óxido de titanio, en combinación con otros metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, como circonio, una aleación y/o un óxido de este elemento, tantalio, una aleación y/o un óxido de este elemento, hafnio, una aleación y/o un óxido de este elemento, niobio, una aleación y/o un óxido de este elemento, una aleación de cromo-vanadio 7/o un óxido combinado y acero inoxidable. Dicho implante también puede ser un material de injerto, preferiblemente un andamiaje de óxido metálico que consta de óxido de titanio.

En algunos aspectos de la invención, el implante biocompatible de conformidad con la invención se puede exponer a radiación UV antes, durante o después del revestimiento con un IP. El TiO_2 es un fotocatalizador bien conocido (Nakamura, Sirghi et al. 2002). Si la superficie se irradia con luz UV, se generan pares electrón-hueco, se liberan compuestos reactivos de oxígeno, y las moléculas de agua se disocian y adsorben en la superficie. Esos grupos hidróxido provocan una mayor hidrofilicidad de la superficie.

Es importante comprender que cuando se cita IP en el contexto de cualquier aspecto o forma de realización de la invención, esto incluye el inositol fosfato, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, incluso aunque en tal contexto no se haga referencia explícita a ello, e incluso aunque sólo se mencione IP.

Dicho IP puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 grupos fosfato. Un ejemplo de IP es un IP que cuenta con 6 grupos fosfato, que también se puede denominar indistintamente fitato, IP6 o IP6, (mio-inositol-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaquisfosfato; véase la figura 2).

Cuando en el contexto de la presente invención se menciona un ligador, se hace referencia a una entidad química que se utiliza para unir dicho IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del implante biocompatible, formando así un enlace covalente entre el fitato y el metal, aleación metálica y/u óxido metálico. Una parte del ligador reacciona con la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico y, por tanto, se une a ella. Otra parte del ligador reacciona con el citado IP, ester de un IP y/o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, y se une a él, de modo que se forma un enlace covalente entre dicho IP y la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico. Esto puede proporcionar una superficie de dicho implante biocompatible que module, y preferiblemente mejore, la oseointegración de forma particularmente activa. Algunos ejemplos de ligadores que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención son ligadores seleccionados del grupo formado por anhídridos, alcoholes, ácidos, aminas, epoxis, isocianatos, silanos, grupos halogenados y grupos polimerizables. El ligador seleccionado del grupo de los silanos puede ser (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES).

Como se ha mencionado en el presente documento, un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, tiene un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, unido de forma covalente a por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible. Asimismo, en esta definición también se incluyen los implantes con un revestimiento de IP unido de forma covalente sobre una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico.

También se engloba en la presente invención un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, en el que una combinación de IP está unida de forma covalente a por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de dicho implante biocompatible, y la citada combinación incluye IP6 y como mínimo uno de los otros IP con menos grupos fosfato, como de inositol trifosfato a inositol pentafosfato (IP3 a IP5), como por ejemplo IP5.

Algunos ejemplos de esteres de IP que se engloban en la presente invención son los esteres de alquilo C_1-C_{20}, como los esteres de alquilo C_1-C_{10}, los esteres de alquilo C_1-C_6 y los esteres de alquilo C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9 o C_{10}.

Cuando se menciona "por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico" esto significa que una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico, o bien de una combinación de las citadas sustancias, de un implante no tiene que estar completamente cubierta por IP unido de forma covalente, sino que algunas partes de la superficie metálica, de una aleación metálica y/o de un óxido metálico pueden carecer de un revestimiento de IP, contener menos IP y/o algunas partes de la superficie metálica, de una aleación metálica y/o de un óxido metálico también pueden incluir IP fijado de forma física además del IP unido de forma covalente, por ejemplo, si queda después del tratamiento de la superficie para fijarle el IP. Además, algunas partes de la superficie del implante de conformidad con la presente invención no tienen por qué incluir un metal, aleación metálica y/u óxido metálico, sino que en su lugar pueden incluir otros materiales o combinaciones de los mismos.

En el presente documento se presenta un implante biocompatible, en el que el IP, ester de un IP y/o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, unido de forma covalente a una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del implante, corresponde aproximadamente a por lo menos el 50% del peso del peso total del IP, ester de IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, presente en la citada superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico. En otros aspectos, por lo menos aproximadamente un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% del peso del peso total del IP está unido de forma covalente a una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante.

Un revestimiento que incluye compuestos de IP unidos de forma covalente también puede incluir otras biomoléculas activas sobre la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de dicho implante, como por ejemplo, sin que ello suponga ningún tipo de limitación, biomoléculas naturales (esto es, moléculas de origen natural obtenidas de fuentes naturales), biomoléculas sintéticas (esto es, biomoléculas de origen natural preparadas de forma sintética y moléculas de origen no natural o formas de moléculas preparadas sintéticamente) o biomoléculas recombinantes (preparadas mediante el uso de técnicas de recombinación). Algunos ejemplos de biomoléculas de interés son, sin que ello suponga ningún tipo de limitación, biomoléculas, como bioadhesivos, factores de adhesión celular, biopolímeros, proteínas sanguíneas, enzimas, biomoléculas y proteínas de la matriz extracelular, hormonas y factores de crecimiento, ácidos nucleicos (DNA y RNA), receptores, biomoléculas sintéticas, vitaminas, fármacos,

como por ejemplo bifosfonatos, iones activos biológicamente, como por ejemplo fluoruro, biomoléculas marcadoras, etc.

Cuando se forma un enlace covalente entre dicho IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, y una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible, esto también hace referencia a un implante biocompatible que consta de un revestimiento con un IP unido de forma covalente y un ligador, como por ejemplo APTES. Así pues, en este contexto, los términos revestimiento, revestido, unido a, cubierta y cubierto, se pueden utilizar indistintamente en el presente documento en el contexto de la descripción de la superficie del implante.

En el presente documento, un enlace covalente del IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, con una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico se realiza mediante por lo menos un ligador. Por consiguiente, dicho ligador puede unirse por una de sus partes a una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico mediante una reacción química entre dicha parte del citado ligador y la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico. En otra de sus partes, el ligador puede unirse al citado IP, ester de un IP y/o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, mediante una reacción química entre dicha parte del citado ligador y el IP. Así, un enlace covalente entre una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico y dicho IP se puede formar mediante el citado ligador. En consecuencia, cuando se utiliza un ligador en el contexto de la presente invención, dicho ligador puede formar un enlace covalente entre el citado IP y la superficie metálica. El enlace entre el ligador y, por un lado, el citado IP y, por otro, la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico puede formarse en cualquier parte del ligador que sea adecuada para la finalidad en cuestión, es decir, una parte del ligador que puede reaccionar químicamente con el IP o la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico. Por tanto, se producirá una reacción química entre las respectivas partes del ligador, el IP y la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico por la acción de los grupos químicamente reactivos. En las figuras 1 y 2 se muestra un ejemplo de este hecho.

Dicho ligador puede ser un ligador que contenga silicio, como 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES). Asimismo, un ligador de este tipo también puede seleccionarse del grupo de los silanos. Además, un ligador de este tipo es aplicable a todos los aspectos de la invención. En consecuencia, la presente invención también hace referencia a un implante biocompatible, que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, como se ejemplifica en el presente documento, en el que dicho metal, aleación metálica y/u óxido metálico está presente sobre una superficie del citado implante biocompatible, y en el que un ligador y un IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, forma un revestimiento sobre como mínimo una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible, revestimiento que incluye un IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, que se une de forma mayoritariamente covalente a la citada superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico.

En todos los aspectos de la invención, un metal, aleación metálica y/u óxido metálico se puede seleccionar del grupo formado por titanio, una aleación y/o un óxido de este elemento, circonio, una aleación y/o un óxido de este elemento, tantalio, una aleación y/o un óxido de este elemento, hafnio, una aleación y/o un óxido de este elemento, niobio, una aleación y/o un óxido de este elemento, una aleación de cromo-vanadio y/o un óxido combinado y acero inoxidable. De conformidad con la presente invención, este tipo de metal puede ser titanio, una aleación de titanio y/o un óxido de titanio. Dicho implante también puede ser un material de injerto, preferiblemente un andamiaje de óxido metálico que consta de óxido de titanio.

Como se ha mencionado con anterioridad en el presente documento, un implante biocompatible puede ser un implante quirúrgico, un implante ortopédico, un implante dental o un dispositivo de fijación ortopédico. Un implante biocompatible de conformidad con la invención también puede ser un dispositivo seleccionado de entre una prótesis ortopédica articular y un disco protésico para fijación vertebral.

La presente invención también hace referencia a un método para la fabricación de un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, como se ha ejemplificado en el presente documento, como titanio, una aleación de titanio y/o un óxido de titanio, en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible. Un método incluye la adición de un IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, a una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de dicho implante biocompatible y la reacción del IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias con la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de dicho implante biocompatible.

El método para la fabricación de un implante biocompatible además comprende un paso de pretratamiento químico de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de un implante biocompatible antes de que entre en contacto o reaccione con un IP, ester de un IP y/o sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias. Posteriormente, una vez que se ha aplicado, como mínimo una parte del IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, forma un enlace covalente con una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante. El método también incluye un paso de entrada en contacto, reacción y formación de un enlace de un ligador con una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico pretratada químicamente antes de la entrada en contacto del IP con la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico. Posteriormente, el IP entra en contacto con la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico con la que el ligador ya ha formado un enlace, para así reaccionar con ella. El enlace covalente se forma entre el IP y la citada superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico mediante un ligador. Los pasos citados con anterioridad consistentes en la fijación de un ligador y un IP a una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico también se pueden realizar en un orden distinto.

Como se ha mencionado en el presente documento, dicho ligador puede incluir silicio, y el citado ligador que incluye silicio puede ser 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES), que se utiliza en un método como el descrito en el presente documento. Un método también puede incluir un paso de lavado después de la adición del IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, a la superficie pretratada químicamente de dicho implante. Como se ha mencionado en el presente documento, un implante biocompatible utilizado en un método como el aquí descrito puede incluir un metal, aleación metálica y/u óxido metálico seleccionado del grupo formado por titanio, una aleación y/o un óxido de este elemento, circonio, una aleación y/o un óxido de este elemento, tantalio, una aleación y/o un óxido de este elemento, hafnio, una aleación y/o un óxido de este elemento, niobio, una aleación y/o un óxido de este elemento, una aleación de cromo-vanadio y/o un óxido combinado y acero inoxidable.

Un pretratamiento de conformidad con la presente invención puede realizarse, por ejemplo, mediante pasivación, la aplicación de una solución piraña o bien mediante la aplicación de una o varias soluciones alcalinas. En la sección dedicada a experimentos se describen algunos ejemplos no restrictivos de estos pretratamientos. Asimismo, en un paso independiente de un método, el IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, se activa como se describe en el presente documento antes de su adición a una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico opcionalmente pretratada químicamente de dicho implante biocompatible.

Dicha activación se puede realizar mediante la adición de un reticulante de carbodiimida, como N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), al citado IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias. Esta activación también puede incluir la formación de un fosforamidato durante la citada activación.

La formación de un fosforamidato, que se describe con mayor detalle en la figura 2, incluye los pasos de adición de hidrocloruro de 1-etil-3-3-dimetilaminopropilcarbodiimida al IP, para la formación de un ester activo, y posterior adición de imidazol para la formación de un fosforamidato activo. El fosforamidato activo que incluye el IP posteriormente se añade a una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del implante.

En consecuencia, la presente invención también hace referencia a un método que incluye la formación de un fosforamidato, que consta de los pasos de adición de hidrocloruro de 1-etil-3-3-dimetilaminopropilcarbodiimida al citado IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de las citadas sustancias, para la formación de un ester activo y, posteriormente, adición de imidazol al citado ester activo para la formación de un fosforamidato activo. Cabe destacar que el objetivo de esta reacción consiste en generar un IP de conformidad con la invención con un grupo saliente adecuado, de modo que también se puedan utilizar otros reactivos apropiados para la realización de una reacción de este tipo.

Por tanto, aquí se describe un método en el que un ligador, como APTES, se hace reaccionar en primer lugar con una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de un implante pretratada químicamente, y en el que el IP se activa y, posteriormente, se hace reaccionar con el ligador unido a la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico para formar un enlace covalente estable entre la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico y el IP.

La presente invención también hace referencia a un implante biocompatible que se puede obtener mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En otros aspectos, la presente invención también se refiere a un implante biocompatible para su uso en un método para la introducción de un implante biocompatible según la definición del presente documento en un paciente que lo necesite, método que incluye los pasos de dotación de un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado

del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, y/o bien una combinación de las citadas sustancias, y por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible y, posteriormente, dicho implante se introduce en el paciente en cuestión mediante una intervención quirúrgica. Un implante de la invención se puede introducir en un paciente que necesite una prótesis de una parte del cuerpo, como una cadera o una rodilla, y en el que se necesita la modulación, y preferiblemente mejora, de las propiedades de oseointegración.

La presente invención también hace referencia a un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible, para su uso en la modulación, preferiblemente mejora, de la oseointegración.

En otro aspecto, en el presente documento se describe un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y como mínimo una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible, para su uso en la modulación, preferiblemente mejora, de la oseointegración, y en el que el efecto oseointegrador se logra gracias a la combinación del IP unido de forma covalente con la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico, enlace covalente que, de forma opcional, se forma mediante como mínimo un ligador, como por ejemplo APTES. De conformidad con la anterior descripción, la presente invención también hace referencia al uso de un implante biocompatible que incluye uno o varios metales, aleaciones metálicas y/u óxidos metálicos, en el que se forma un enlace covalente entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de las citadas sustancias, y por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del citado implante biocompatible, en la fabricación de un dispositivo médico para su uso en la modulación, preferiblemente mejora, de la oseointegración.

La invención se describe con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no restrictivos.

SECCIÓN DEDICADA A EXPERIMENTOS

Abreviaturas y acrónimos

ALP: Fosfatasa alcalina
APTES: (3-aminopropil) trietoxisilano
ΔH: Entalpía
BrdU: Bromodeoxiuridina
CalcR: Receptor de calcitonina
Car2: Anhidrasa carbónica de tipo II
CEIC-IB: Comité ético de las Islas Baleares
CFMS: Receptor del factor estimulante de colonias
Col1A: Colágeno de tipo 1
CtsK: Catepsina K
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM-LG: Medio Eagle modificado por Dulbecco con glucosa baja y Glutamax
EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
EDS: Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva
SFB: Suero fetal bovino
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
ATPasa H+: ATPasa H+ de tipo vacuolar
hUC-MSC: Células madre mesenquimatosas obtenidas de cordón umbilical humano
ICP-AES: Espectrómetro de emisión atómica por plasma
IP6: Mio-inositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato, ácido fítico, fitato
LDH: Lactato deshidrogenasa
MMP-9: Metaloproteinasa-9
OC: Osteocalcina
OCL: Osteoclastos
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pNPP: p-nitrofenil fosfato
RANKL: Ligando del receptor activador de NF-κB
rRNA: RNA ribosómico
Runx2: Factor de transcripción relacionado con Runt 2

SEM: Microscopía electrónica de barrido
Ti: Titanio
TRAP: Fosfatasa ácida tartrato resistente
UV: Ultravioleta

Reactivos de los experimentos

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) proporcionó APTES, tolueno, EDC, imidazol, ácido sulfúrico, alcohol isopropílico, acetona, etanol, hidróxido sódico, el kit de tinción TRAP, FITC-faloidina, Fluoroshield con DAPI, ácido ascórbico, β-glicerofosfato, hidrocortisona, colagenasa de tipo IA y *p*-nitrofenil fosfato. Kronos Titan GmbH (Leverkusen, Alemania) suministró polvo de TiO_2 (Kronos 1171). ATCC (Manassas, VA, EE. UU.) proporcionó la línea celular monocítica murina transformada RAW 264.7. DSMZ (Braunschweig, Alemania) suministró la línea celular osteoblástica murina MC3T3-E1. PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria) proporcionó DMEM, suero fetal bovino, penicilina y estreptomicina. GIBCO (Grand Island, NY, EE. UU.) suministró el medio esencial mínimo αy DMEM-LG. El SFB se adquirió a HyClone (Thermo Scientific, Logan, EE. UU.). Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) proporcionó el kit de detección de citotoxicidad (LDH), el kit ELISA de proliferación celular, el reactivo Tripure, Lightcycler-FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I y midazolam (Dormicum®). PeproTech (Rocky Hill, NJ, EE. UU.) suministró RANKL. Applied Biosystems Life Technologies (Carlsbad, California, EE. UU.) proporcionó el kit de RNA a cDNA de alta capacidad. Los cortes de dentina se adquirieron a Immunodiagnostic Systems (Boldon, Reino Unido). Promega (Madison, EE. UU.) proporcionó la fosfatasa alcalina. Pierce (Rockford, IL, EE. UU.) suministró el kit de determinación de proteínas BCA. La lidocaína/adrenalina (Xylocain/Adrenalin®) se adquirió a AstraTech AB (Molndal, Suecia). Galderma (Nordic AB, Suecia) proporcionó gluconato de clorhexidina (Klorhexidin). Reckitt & Colman (Hull, Reino Unido) suministró buprenorfina (Temgesic®). La fluanisona/fentanilo (Hypnorm®) se adquirió a Janssen Pharmaceutica (Beerse, Bélgica). Rikshospitalets Apotek (Oslo, Noruega) proporcionó pentobarbital (Mebumal®).

Panreac (Barcelona, España) y Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) suministraron otras sustancias químicas estándar.

Ejemplo 1: Enlace covalente entre ácido fítico e implantes de titanio mediante un ligador

El IP6 se unió de forma covalente sobre los discos de titanio mediante el uso de un ligador de silicio. En particular, los grupos hidroxilo de la superficie de TiO_2 reaccionaron con los grupos alcoxi del APTES formando así un enlace covalente -Si-O-Si- que supuso la inmovilización de la fracción aminosiloxano en la superficie de TiO_2. Por otro lado, se ha formulado la hipótesis de que la derivación de los grupos fosfato IP6 con el reticulante de carbodiimida (EDC) e imidazol favorecería el enlace covalente con la superficie de titanio aminosiloxano (véase la figura 2).

Materiales y métodos

1. Silanización

Se silanizaron monedas de titanio en una solución de tolueno con APTES al 10% a temperatura ambiente durante 24 horas, y se secaron al vacío durante la noche.

2. Enlace covalente de IP6

Las monedas de titanio silanizadas se sumergieron en una solución acuosa de EDC e IP6. Se añadieron de inmediato 3 mL de una solución de imidazol de 6000 mg/L y la mezcla se sometió a un baño ultrasónico a temperatura ambiente. La EDC y el IP6 que no reaccionaron y los demás subproductos se eliminaron mediante un lavado suave con agua. Finalmente, las monedas de titanio se secaron al vacío durante la noche.

3. Caracterización de las superficies modificadas mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de rayos X por energía dispersiva

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) HITACHI S-3400N para estudiar la superficie de las monedas de titanio modificadas. Se empleó el sistema de microanálisis R-X EDS, Bruker AXS XFlash 4010 para el análisis cualitativo y semicuantitativo.

4. Cuantificación del fósforo inmovilizado

Las monedas de titanio con la superficie modificada se trataron con ácido nítrico 2N y se calentaron durante 30 minutos a 50 ºC. El contenido de fósforo total se determinó mediante espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) con el espectrómetro Perkin-Elmer Optima 5300.

Resultados

Las monedas de titanio modificadas se analizaron con SEM-EDS e ICP-AES, lo que confirmó la detección de picos de silicio y fósforo en la superficie de titanio (figura 3). Asimismo, tras las pruebas para lograr la autorización de las monedas de titanio modificadas se detectó fósforo en forma de solución, hallazgo coherente con el hecho de que el IP6 estaba fijado a la superficie de titanio. La correlación de la señal de fósforo con cantidades de IP6 depositadas sobre la moneda de titanio indicó una cantidad de IP6 fijado de 1,64 µg/moneda de titanio.

Ejemplo 2: Adsorción física frente a enlace covalente entre ácido fítico e implantes de titanio

Como método alternativo de enlace covalente, el IP6 también se puede adsorber físicamente sobre una superficie de titanio. Los grupos fosfato con carga negativa contenidos en la molécula de IP6 muestran una gran afinidad por las superficies de óxido metálico y, por tanto, pueden interactuar directamente con la superficie de titanio. Esta fijación (denominada fisisorción) se consigue mediante fuerzas intermoleculares de energía de enlace baja ($\Delta H < 50$ kJ mol-1), es decir, las fuerzas de Van der Waals. A causa de las fuerzas de enlace bajas, este tipo de adsorción es reversible mediante un simple lavado, por lo que el dispositivo médico no es apto para la modulación de las propiedades de oseointegración. En este ejemplo, comparamos el revestimiento de las superficies de titanio con IP6 mediante adsorción física y mediante enlace covalente.

Materiales y métodos

1. *Adsorción física*

Las monedas de titanio se enjuagaron con agua esterilizada en autoclave y se lavaron con etanol para después someterse a un baño ultrasónico en agua esterilizada en autoclave durante cinco minutos. Por último, se lavaron con agua pura. La solución de IP6 (en concentraciones de 0,1 mg/ml y 1 mg/ml en etanol al 70%) se esterilizó mediante filtración. Se aplicaron 10 µl de la respectiva solución de IP6 a la superficie de las monedas, que se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

2. *Enlace covalente*

Se utilizó el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

3. *Caracterización de las superficies modificadas mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de rayos X por energía dispersiva*

Se utilizó el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

4. *Cuantificación del fósforo inmovilizado*

Se utilizó el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

Resultados

Tras la adsorción física, una parte de las muestras se enjuagó con agua esterilizada en autoclave para eliminar el IP6 no unido y la parte restante se analizó directamente mediante SEM-EDS e ICP-AES. El análisis mediante EDS mostró picos de sodio y fósforo en la superficie de titanio tras la adsorción física sin enjuagado (figura 4a). Sin embargo, estas señales desaparecieron cuando las muestras se enjuagaron con agua esterilizada en autoclave (figura 4b). Los resultados de la EDS se confirmaron con las observaciones del análisis mediante ICP-AES (no se muestran los datos).

Se puso de manifiesto que la adsorción física de IP6 en las superficies de titanio tiene como resultado una interacción muy débil, puesto que casi todo el IP6 se elimina simplemente mediante el enjuagado de las monedas en agua durante cinco segundos. Por tanto, la adsorción física directa de IP6 en monedas de titanio no es un proceso factible para formar un enlace entre esta molécula y monedas de titanio ni para preparar un revestimiento bioactivo.

Ejemplo 3: Pretratamiento químico (solución alcalina, pasivación y solución piraña) y enlace covalente entre ácido fítico e implantes de titanio mediante un ligador

La fijación covalente de compuestos de silicio en superficies de titanio se basa en la capacidad intrínseca de los grupos silanol de reaccionar con los grupos hidroxilo presentes en la capa oxidada de una superficie activada. Para este fin, se analizaron diversos pretratamientos químicos de la superficie de titanio (pasivación, solución piraña y solución alcalina) para aumentar potencialmente el número de grupos hidroxilo en la superficie de titanio y facilitar así la posterior reacción con APTES. Por tanto, se ha formulado la hipótesis de que el aumento del número de grupos reactivos aminosiloxano facilitaría el enlace covalente de IP6. Tras el pretratamiento químico, las monedas de titanio se sometieron a las condiciones de reacción descritas en la sección dedicada a experimentos del ejemplo 1 para inmovilizar el IP6 con EDC como reticulante.

Materiales y métodos

1. Pretratamiento de pasivación

Las monedas de titanio se sometieron a un baño ultrasónico durante diez minutos en cada una de las siguientes sustancias químicas en orden sucesivo: acetona (70% por volumen), etanol puro y agua. Tras el baño ultrasónico en agua, las monedas se colocaron en una solución de ácido nítrico-agua 3:7 (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras este tratamiento, las muestras se enjuagaron con agua y se sumergieron en un baño de agua cubierto durante 24 horas. Por último, las monedas de titanio se secaron, empaquetaron y almacenaron en etanol al 70% en condiciones de oscuridad a 4 ºC hasta su uso.

2. Pretratamiento con solución piraña

Las monedas de titanio se sometieron en primer lugar a un baño ultrasónico durante 30 minutos en alcohol isopropílico al 70%. Tras el baño ultrasónico, se vertió ácido sulfúrico concentrado en un vaso de precipitados y se añadió lentamente peróxido de hidrógeno al 35% hasta lograr una relación final de 7:3 (v/v) entre ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno, y la solución resultante se mezcló suavemente. Las monedas se sumergieron durante diez minutos en esta solución, tras lo que se recuperaron y colocaron en una segunda solución piraña nueva (ácido sulfúrico concentrado/peróxido de hidrógeno al 35% 7:3 (v/v)) durante cinco minutos. Tras este período, las monedas de titanio se enjuagaron dos veces con agua antes de que colocarse en un baño de agua durante 24 horas. Finalmente, las monedas de titanio se secaron, empaquetaron y almacenaron en etanol al 70% en condiciones de oscuridad a 4 ºC hasta su uso.

3. Pretratamiento con solución alcalina

Las monedas de titanio se limpiaron mediante baños ultrasónicos en agua, acetona y etanol durante 20 minutos cada uno y, finalmente, en agua durante otros diez minutos. Posteriormente, se sumergieron en 5 M de NaOH a 60 ºC durante 24 horas. Tras el período de 24 horas, las placas de sustrato se lavaron suavemente con agua. Por último, las monedas de titanio se secaron, empaquetaron y almacenaron en etanol al 70% en condiciones de oscuridad a 4 ºC hasta su uso.

4. Enlace covalente

Se utilizó el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

5. *Caracterización de las superficies modificadas mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de rayos X por energía dispersiva*

Se utilizó el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

6. Cuantificación del fósforo inmovilizado

Se utilizó el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

Resultados

Se analizaron diversos pretratamientos químicos (pasivación, solución piraña y solución alcalina) para evaluar si una mayor cantidad de grupos hidroxilo presentes en la capa oxidada de la superficie de titanio incrementaría la cantidad de IP6 unido de forma covalente a la superficie. En este experimento se incluyeron superficies no pretratadas químicamente. Las monedas de titanio modificadas resultantes se analizaron mediante SEM-EDS e ICP-AES.

Como pone de manifiesto el análisis mediante SEM-EDS (figura 5), excepto para el pretratamiento con solución alcalina, el resto de monedas de titanio modificadas contenían picos de silicio y fósforo, lo que indica que se logró la inmovilización de IP6 en la superficie de titanio.

Las pruebas para lograr la autorización de las monedas de titanio modificadas y la posterior determinación del contenido total de fósforo mediante ICP-AES confirmó las observaciones anteriores realizadas mediante SEM-EDS. El pretratamiento químico de pasivación seguido de la inmovilización del IP6 permitió la formación de mayores depósitos de IP6 (36,66 µg/moneda de titanio) en comparación con los demás tratamientos.

Ejemplo 4: Enlace covalente entre ácido fítico y andamiajes cerámicos de dióxido de titanio (TiO_2) mediante un ligador

El procedimiento desarrollado en el ejemplo 1 se puede aplicar a andamiajes de TiO_2.

1. *Preparación de andamiajes de TiO_2*

Los andamiajes se pueden preparar mediante el método de esponja polimérica y el uso de polvo de TiO_2. Los andamiajes de TiO_2 se pueden esterilizar antes del experimento en autoclave a 121 ºC durante 20 minutos.

2. *Enlace covalente de IP6*

Se puede utilizar el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

3. *Caracterización de las superficies modificadas mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de rayos X por energía dispersiva*

Se puede utilizar el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

4. *Cuantificación del fósforo inmovilizado*

Se puede utilizar el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 1.

Resultados y discusión de los ejemplos del 1 al 4

Con los ejemplos del 1 al 4, se ha puesto de manifiesto que se han podido superar las dificultades del enlace permanente entre IP6 y la superficie de un implante. Con anterioridad se ha utilizado IP6 para implantes, pero los métodos de unión se centraban principalmente en la absorción fisicoquímica, que se caracteriza por ser una interacción lábil. Esta se puede eliminar fácilmente mediante un simple enjuague como se ha mostrado en el ejemplo 2, lo que pone de manifiesto la disponibilidad limitada de IP6 tras su absorción física (unión lábil) en la superficie del implante. Para unir el IP6 de forma covalente sobre una superficie metálica se han desarrollado y optimizado reacciones orgánicas en la interfase sólido-líquido y se ha fabricado con éxito un implante que incluye IP unido de forma covalente. Asimismo, se ha mostrado que a las monedas de titanio pretratadas químicamente se les puede fijar una mayor cantidad de IP6, y el tratamiento de pasivación es el que permite conseguir mayores depósitos de IP6.

Ejemplo 5: Efecto del ácido fítico en la osteoclastogénesis in vitro

Se analizó el efecto del IP6 en la viabilidad, proliferación y diferenciación celulares de la línea celular murina de monocitos/macrófagos RAW 264.7 en osteoclastos diferenciados. Se analizaron OCL no diferenciados tratados con IP6 para determinar la diferenciación específica y los marcadores funcionales mediante RT-PCR en tiempo real y tinción TRAP. La actividad de OCL también se determinó mediante resorción de discos de dentina y la formación de anillos de actina.

Materiales y métodos

1. Cultivo celular

La línea celular monocítica murina transformada RAW 264.7 se cultivó a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO_2 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (50 UI de penicilina/ml y 50 µg de estreptomicina/ml).

2. Determinación de la citotoxicidad

Las células RAW 264.7 se sembraron con una densidad de 20.000 células/cm2 en una placa de 24 pocillos y se cultivaron durante 24 horas Tras la fijación celular, se cambió el medio de cultivo y se añadieron dosis distintas de IP6. Las células se cultivaron durante 24 horas adicionales y se recuperó el medio de cultivo para determinar la citotoxicidad (actividad de la LDH). La prueba de citotoxicidad de la LDH se realizó con el kit de detección de citotoxicidad siguiendo el protocolo del fabricante. Esta prueba colorimétrica cuantifica la actividad de la LDH liberada por el citosol de las células dañadas en el sobrenadante y, por tanto, constituye un índice de la muerte celular.

Los resultados se presentaron respecto a la actividad de la LDH en el medio de células de control (control bajo, mortalidad celular del 0%) y de células tratadas con Triton X-100 al 1% (control alto, mortalidad del 100%) mediante la ecuación siguiente: Citotoxicidad (%) = (valor exp-control bajo)/(control alto-control bajo)*100.

3. Ensayo de proliferación celular

Las células RAW 264.7 se sembraron con una densidad de 2.500 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 horas. Tras la fijación celular, se cambió el medio de cultivo y se añadieron dosis distintas de

IP6. Las células se cultivaron durante 24 horas adicionales y se añadió BrdU durante las últimas seis horas. La incorporación de BrdU se determinó mediante el kit ELISA de proliferación celular siguiendo las indicaciones del fabricante.

4. Generación de osteoclastos

Se generaron células osteoclastoides en cultivo a partir de las células RAW 264.7. Se sembraron 20.000 células/cm2 en placas de 24 pocillos y se colocaron en la incubadora de CO2 durante la noche para permitir la fijación de las células a la superficie. Después de 24 horas, el medio de cultivo se sustituyó por un medio que contenía 100 ng/mL de RANKL. Se generaron correctamente osteoclastos mediante la dosificación de RANKL cada 48 horas durante un período de cinco días. Para confirmar la generación de células osteoclastoides multinucleadas, las células cultivadas se tiñeron para detectar la enzima TRAP con el kit de tinción TRAP siguiendo las instrucciones del fabricante. TRAP es la enzima que se ha utilizado como marcador de la función osteoclástica durante más de 20 años. Los osteoclastos multinucleados positivos para TRAP se visualizaron mediante microscopía óptica y se fotografiaron. Cada prueba de formación de OCL se realizó un mínimo de tres veces.

5. Efecto del IP6 en la formación de OCL

Para analizar el efecto del IP6 en la formación de OCL, se sembraron 20.000 células/cm2 en placas de 24 pocillos y, después de 24 horas, el medio de cultivo se cambió por un medio que contenía 100 ng/mL de RANKL y distintas dosis de IP6 (0,1, 1, 10, 100 µM). Los tratamientos se añadieron después de cambiar el medio cada 48 horas durante un período de cinco días. El efecto del IP6 en la formación de OCL se evaluó mediante el análisis del número de células positivas para TRAP, los niveles de expresión génica de osteoclastos y marcadores funcionales, la actividad de resorción en discos de dentina y la formación de anillos de actina.

6. Aislamiento de RNA y análisis mediante RT-PCR

El RNA total se aisló con Tripure a partir de células tratadas como se ha descrito con anterioridad, siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se cuantificó con un espectrofotómetro fijado a 260 nm (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.).

La misma cantidad de RNA total (1 mg) de cada muestra se sometió a transcripción inversa para obtener cDNA a 37 °C durante 60 minutos en un volumen final de 20 ml con el kit de RNA a cDNA de alta capacidad (Applied Biosystems, EE. UU.). Cada cDNA se diluyó en una relación de 1/5 y cada una de estas partes se almacenó a -20 ºC hasta que se llevaron a cabo las reacciones de la PCR para así evitar los ciclos de congelación y descongelación. Se realizó la PCR en tiempo real para dos genes constitutivos, rRNA 18S y GAPDH; tres marcadores genéticos de osteoclastos, TRAP, CalcR y CFMS; y cuatro marcadores funcionales de osteoclastos, CtsK, MMP-9, Car2 y ATPasa H+.

La PCR en tiempo real se realizó en el Lightcycler 480® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) con detección de SYBR Green. Cada reacción contenía 7 µl de Lightcycler-FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (formada por Taq polimerasa Fast Start, tampón de reacción, mezcla de dNTP, tinte SYBRGreen I y MgCl2), 0,5 µM de cada uno, los cebadores específicos de las hebras codificante y no codificante (tabla 1) y 3 µl de la dilución de cDNA en un volumen final de 10 µl. El programa de amplificación consistió en un paso de preincubación para la desnaturalización del cDNA modelo (cinco minutos a 95 °C), seguido de 45 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización (diez segundos a 95 °C), un paso de hibridación (diez segundos a 60 °C) y un paso de extensión (diez segundos a 72 °C). Después de cada ciclo, se midió la fluorescencia a 72 °C. Se llevó a cabo un control negativo sin modelo de cDNA en cada ensayo.

Para permitir una cuantificación relativa después de la PCR, se elaboraron curvas estándar a partir de reacciones estándar para cada gen constitutivo y diana. Las lecturas del punto de entrecruzamiento de cada una de las muestras desconocidas se utilizaron para calcular la cantidad de genes diana o constitutivos respecto a una curva estándar mediante el método del máximo de la segunda derivada. Los niveles relativos de mRNA se calcularon como la razón de la concentración relativa de los genes diana de la misma muestra con el método avanzado de cuantificación relativa que proporciona el software de análisis LightCycler 480 versión 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Tabla 1.- *Pares de cebadores y oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR en tiempo real*

Gen	**Secuencias**
mGAPDH	Directa: 5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' (SEQ ID NO: 1) Inversa: 5'-CAGATTGGGGGTAGGAACAC-3' (SEQ ID NO: 2)

rRNA m18S	Directa: 5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3' (SEQ ID NO: 3) Inversa: 5'-CCA TCC AAT CGGTAGTAG CG-3' (SEQ ID NO: 4)
mTRAP	Directa: 5'-GCGACCATTGTTAGCCACATACG-3' (SEQ ID NO: 5) Inversa: 5'-CGTTGATGTCGCACAGAGGGAT-3' (SEQ ID NO: 6)
mCalcR	Directa: 5'-TGGTGCGGCGGGATCCTATAAGT-3' (SEQ ID NO: 7) Inversa: 5'-AGCGTAGGCGTTGCTCGTCG-3' (SEQ ID NO: 8)
mCFMS	Directa: 5'-TGGATGCCTGTGAATGGCTCTG-3' (SEQ ID NO: 9) Inversa: 5'-GTGGGTGTCATTCCAAACCTGC-3' (SEQ ID NO: 10)
mCtsk	Directa: 5'-AGCAGAACGGAGGCATTGACTC-3' (SEQ ID NO: 11) Inversa: 5'-TTTAGCTGCCTTTGCCGTGGC-3' (SEQ ID NO: 12)
mMMP-9	Directa: 5'-GCTGACTACGATAAGGACGGCA-3' (SEQ ID NO: 13) Inversa: 5'-GCGGCCCTCAAAGATGAACGG-3' (SEQ ID NO: 14)
mCar2	Directa: 5'-CTCTGCTGGAATGTGTGACCTG-3' (SEQ ID NO: 15) Inversa: 5'-CTGAGCTGGACGCCAGTTGTC-3' (SEQ ID NO: 16)
ATPasa mH^+	Directa: 5'-ACGGTGATGTCACAGCAGACGT-3' (SEQ ID NO: 17) Inversa: 5'-CCTCTGGATAGAGCCTGCCGCA-3' (SEQ ID NO: 18)

7. Ensayo de cavidad de resorción

Se sembraron células RAW 264.7 sobre cortes de dentina con una densidad de 20.000 células/cm^2. Para estudiar el efecto del IP6 en la formación de OCL, se cultivaron células con un medio que contenía 100 ng/mL de RANKL e IP6 (1 µM) durante el transcurso de todo el experimento. Para estudiar el efecto del IP6 en las células osteoclastoides maduras, se generaron OCL mediante la dosificación de RANKL a células RAW 264.7 durante un período de seis días y, posteriormente, se trataron con IP6 (1 µM) durante cuatro días.

Después del período de cultivo, las células se eliminaron de los cortes de dentina mediante un baño ultrasónico en 0,1 N de NaOH durante dos minutos, se tiñeron en hematoxilina durante 40 segundos y se lavaron con agua destilada. La superficie de cada corte de dentina se analizó mediante microscopía óptica para detectar indicios de resorción lagunar y se realizó un análisis cuantitativo del área de resorción con el software Image J 1.44p (NIH, EE. UU.).

8. Tinción del anillo de actina

Se sembraron células RAW 264.7 en cubreobjetos con una concentración de 20.000 células/cm2 y se trataron como se ha descrito con anterioridad. A continuación, se fijaron los cubreobjetos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% durante diez minutos, y se tiñeron con 50 µg/mL de FITC-faloidina durante 30 minutos. Los cubreobjetos se lavaron en PBS y los núcleos se tiñeron con Fluoroshield con DAPI. Los anillos de actina se visualizaron mediante microscopía confocal y un investigador sin acceso a los datos del experimento calculó el porcentaje del número total de osteoclastos con anillo de actina, con el anillo de actina intacto (75-100%), con el anillo de actina alterado (25-50%) y sin anillo de actina (0-25%).

Resultados

Se ha puesto de manifiesto que el IP6 reduce la osteoclastogénesis en células RAW 264.7 inducidas mediante RANKL, sin que ello afecte a la proliferación celular ni a la viabilidad celular (figura 6). El IP6 en células tratadas con RANKL redujo el número de células positivas para TRAP y los niveles de mRNA de marcadores de osteoclastos como TRAP, el receptor de calcitonina, la catepsina K y MMP-9 (figuras de la 7 a la 10). Estos resultados muestran que el IP6 disminuye la generación de osteoclastos maduros sin afectar a su viabilidad celular o capacidad de proliferación.

Ejemplo 6: Efecto del ácido fítico en la diferenciación de osteoblastos de células madre mesenquimatosas de cordón umbilical humano (hUC-MSC) in vitro

Se analizó el efecto del IP6 en la diferenciación de células madre mesenquimatosas de cordón umbilical humano (hUC-MSC) en osteoblastos en condiciones osteogénicas. Las células madre mesenquimatosas (MSC) se pueden diferenciar en múltiples linajes, como osteoblastos, osteocitos, adipocitos, condrocitos y células neuronales progenitoras tempranas. Las hUC-MSC tratadas durante 19 días con IP6 se analizaron para determinar la presencia de marcadores de osteoblastos con la RT-PCR en tiempo real.

Materiales y métodos

1. Aislamiento de hUC-MSC

Las células madre mesenquimatosas obtenidas de cordón umbilical humano (hUC-MSC) se aislaron de cordones umbilicales obtenidos del proceso de donación de sangre de cordón umbilical humano en el ámbito del programa Concordia de donación de sangre de cordón umbilical. Las muestras se recogieron tras la obtención del consentimiento informado y con la autorización del CEIC-IB.

Para aislar hUC-MSC, el cordón se enjuagó varias veces con solución salina estéril, la sangre del cordón se drenó y los coágulos se eliminaron de los vasos mediante lavado. Acto seguido, el cordón se cortó en pequeños trozos y se incubó con colagenasa de tipo IA al 0,075% durante dos horas. A continuación, se añadió tripsina al 0,125% durante 30 minutos con una suave agitación a 37 ºC. La mezcla digerida se pasó por un filtro de 100 µm para obtener suspensiones celulares. Los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en un tampón de lisis eritrocitaria basado en NH4Cl, incubado durante diez minutos a temperatura ambiente y lavado en PBS. Por último, las células se volvieron a poner en suspensión en DMEM-LG y SFB al 20% y se prepararon en una placa en un matraz de cultivo celular no revestido de 25 cm2. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera humidificada con un 5% de CO2 a 37 ºC. Después de tres días de cultivo, el medio se cambió y se eliminaron las células no adherentes. Desde entonces, el medio se cambió dos veces por semana. Una vez que se alcanzó el 80% de confluencia, las células adherentes se volvieron a preparar en una placa con una densidad de 1 x 104 células/cm2.

2. Cultivo celular

Las hUC-MSC de dos donantes distintos se sembraron (n = 12) en placas de 24 pocillos y proliferaron hasta llegar a la confluencia en un medio de proliferación formado por DMEM-LG complementado con penicilina (50 UI/ml), estreptomicina (50 µg/ml) y un SFB al 20%. Las células se cultivaron a 37 ºC en una atmósfera humidificada con un 5% de CO2. Al llegar a la confluencia (hecho designado como día 0), las células se diferenciaron en medio de diferenciación complementado con hidrocortisona (200 nM), ácido ascórbico (50 µg/ml) y β-glicerofosfato (10 mM). El medio de cultivo celular, con o sin IP6, se regeneró dos veces a la semana a lo largo de un período de 19 días.

3. Aislamiento de RNA y análisis mediante RT-PCR

Se utilizó el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 5. En este ejemplo, se realizó la PCR en tiempo real para dos genes constitutivos, beta-actina y GAPDH; y para cuatro marcadores de osteoblastos, Runx2, Col1A, ALP y OC.

Tabla 2.- *Pares de cebadores y oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR en tiempo real de hUC-MSC*

Gen	Secuencias
hGAPDH	Directa: 5'-TGCACCACC-AACTGCTTAGC-3' (SEQ ID NO: 19) Inversa: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3' (SEQ ID NO: 20)
hbeta-actina	Directa: 5'-AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA-3' (SEQ ID NO: 21) Inversa: 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' (SEQ ID NO: 22)
hRunx2	Directa: 5'-CTGTGCTCGGTGCTGCCCTC-3' (SEQ ID NO: 23) Inversa: 5'-CGTTACCCGC-CATGACAGTA-3' (SEQ ID NO: 24)
hCol1A	Directa: 5'-CCTGACGCACGGCCAAGAGG-3' (SEQ ID NO: 25) Inversa: 5'-GGCAGGGCTCGGGTTTCCAC-3' (SEQ ID NO: 26)
hALP	Directa: 5'-CCGCTATCCTGGCTCCGTGC-3' (SEQ ID NO: 27) Inversa: 5'-GGTGGGCTGGCAGTGGTCAG-3' (SEQ ID NO: 28)
hOC	Directa: 5'-GAAGCCCAGCGGTGCA-3' (SEQ ID NO: 29) Inversa: 5'-CACTACCTCGCTGCCCTCC-3' (SEQ ID NO: 30)

Resultados

Se ha puesto de manifiesto que el tratamiento con IP6 induce mayores niveles de mRNA de Runx-2, ALP y OC en comparación con el grupo de control. En cambio, los niveles de mRNA de Col1A son inferiores en las células tratadas con IP6 que en el grupo de control (figura 11). Col1A es un marcador de proliferación y se sabe que sus niveles disminuyen una vez que ha empezado la diferenciación de células osteoblásticas. Estos resultados indican que el tratamiento con IP6 aumenta la diferenciación de osteoblastos de hUC-MSC.

Ejemplo 7: Efecto de los implantes de titanio revestidos con ácido fítico (enlace covalente con un ligador y pretratamiento químico) en la respuesta biológica de osteoclastos in vitro

Se puede aplicar el mismo procedimiento del ejemplo 5 al ácido fítico unido de forma covalente a los implantes de titanio (preparado como se describe en los ejemplos 1 y 4).

Ejemplo 8: Efecto de los implantes de titanio revestidos con ácido fítico (enlace covalente con un ligador y pretratamiento químico) en la respuesta biológica de osteoblastos in vitro

Se analizó el efecto del ácido fítico unido de forma covalente a implantes de titanio en la viabilidad celular y la expresión de marcadores de osteoblastos en células osteoblastoides (MC3T3-E1).

Materiales y métodos

1. Enlace covalente de IP6

Se puede formar un enlace covalente entre el ácido fítico y los implantes de titanio como se describe en los ejemplos 1 y 4. Se analizaron tres tipos de monedas de titanio, que se prepararon como se describe en los ejemplos 1 y 4, monedas de titanio, monedas de titanio pretratadas (pasivadas) y ligadas con APTES, y monedas de titanio pretratadas (pasivadas) y ligadas con APTES e IP6.

2. Cultivo celular

La línea celular osteoblástica murina MC3T3-E1 se mantuvo en un medio esencial mínimo α complementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO2. Para analizar las diversas modificaciones superficiales de los implantes de titanio, las monedas se colocaron en una placa de 96 pocillos y se sembraron 10^4 células en cada moneda.

3. Determinación de la citotoxicidad

La prueba de la citotoxicidad de la LDH se realizó como en el ejemplo 5. Los resultados se presentaron respecto a la actividad de la LDH en el medio de células cultivadas en los implantes de titanio de control (control bajo, mortalidad celular del 0%) y de células tratadas con Triton X-100 al 1% (control alto, mortalidad del 100%) mediante la ecuación siguiente: Citotoxicidad (%) = (valor exp-control bajo)/(control alto-control bajo)*100.

4. Aislamiento de RNA y análisis mediante RT-PCR

Se utilizó el procedimiento de experimento desarrollado en el ejemplo 5. En este ejemplo, se realizó la PCR en tiempo real para dos genes constitutivos, GAPDH (SEQ ID NO: 1 y 2) y la osteocalcina como marcador de osteoblastos (directa: 5'-CCGGGAGCAGTGTGAGCTTA-3' (SEQ ID NO: 31), inversa: 5'-TAGATGCGTTTGTAGGCGGTC-3' (SEQ ID NO: 32).

Resultados

Se ha puesto de manifiesto que el ácido fítico unido de forma covalente a implantes de titanio no es tóxico para las células (figura 12). Asimismo, se detectó un incremento de los niveles de mRNA de osteocalcina inducido por el IP6 unido de forma covalente a implantes de titanio en comparación con los implantes de titanio de control y los implantes de titanio pasivados y ligados con APTES (sin IP6) (figura 12). Estos resultados indican que el IP6 unido de forma covalente a implantes de titanio aumenta la diferenciación de osteoblastos.

Ejemplo 9: Efecto de los implantes de titanio revestidos con ácido fítico (enlace covalente con un ligador y pretratamiento químico) en la respuesta biológica in vivo

El efecto de ácido fítico unido de forma covalente a implantes de titanio se puede analizar en un modelo con animales in vivo. El modelo de elección es un modelo de adherencia en la tibia proximal de conejos blancos neozelandeses. El modelo utiliza implantes en forma de moneda modificados sólo en el lado de ensayo, que está en contacto con el hueso cortical. En el lado opuesto, un orificio roscado permite la fijación de una plantilla calibrada extraíble. Cuando se aplica fuerza desde la plantilla en sentido perpendicular a la superficie de ensayo del implante, se puede registrar el punto de fijación ósea sin influencia de fricción o inmovilización mecánica.

Materiales y métodos

1. Enlace covalente de IP6

Se pueden analizar tres tipos de monedas de titanio, que se pueden preparar como se describe en los ejemplos 1 y 4: monedas de titanio pretratadas (pasivadas), monedas de titanio pretratadas (pasivadas) y ligadas con APTES, y monedas de titanio tratadas nuevamente (pasivadas) y ligadas con APTES e IP6.

2. *Animales de laboratorio y técnica quirúrgica*

En el estudio se pueden utilizar seis (6) conejos blancos neozelandeses hembra, de seis meses de edad y 3,0-3,5 kg (ESF Produkter Estuna AB, Norrtaïje, Suecia). Los animales se pueden mantener en jaulas durante el período del experimento. La temperatura ambiente se puede regular a 19 ± 1 ^{0}C y la humedad al 55 ± 10%.

Los experimentos se pueden realizar una vez que se cuente con la autorización de la Norwegian Animal Research Authority y esta autoridad los haya registrado. Las intervenciones se deben llevar a cabo de conformidad con la ley de bienestar animal de 20 de diciembre de 1974, n.º 73, capítulo VI, secciones 20-22, y la regulación sobre la experimentación en animales de 15 de enero de 1996. Los conejos se pueden sedar mediante una inyección s.c. de 0,05-0,1 ml/kg de fluanisona/fentanilo (Hypnorm®, Janssen, Bélgica) y otra i.v. de 2 mg/kg de peso corporal de midazolam diez minutos antes de que se saque a los animales de las jaulas. Ante cualquier signo de despertar, se debe administrar lentamente una inyección i.v. de Hypnorm® diluido hasta la consecución de un efecto adecuado. Se puede administrar una inyección s.c. de 1,8 ml de lidocaína/adrenalina localmente en el lugar de la operación. Antes de la cirugía, los puntos de la intervención se pueden depilar y lavar con jabón suave. Los animales se pueden colocar en decúbito supino sobre la mesa de operaciones, cubiertos con campos estériles, y los puntos de la intervención se pueden desinfectar con 5 mg/ml de gluconato de clorhexidina. Se puede practicar una incisión en la parte proximal-anterior de la tibia que penetre en todas las capas de tejido blando. El periostio se puede elevar y mantener en su lugar con un retractor automático. Con la ayuda de una guía para broca, se pueden practicar cuatro orificios guía con una broca (Medicon® CMS, Tuttlingen, Alemania) para garantizar una colocación correcta y estandarizada. Se puede utilizar una fresa de acero inoxidable a medida (6,25 mm de diámetro) montada en una broca para implantes dentales de baja velocidad para el establecimiento de una plataforma para los implantes de titanio. Las monedas de titanio (como se describen en los ejemplos 1 y 4) se pueden colocar siguiendo una estructura aleatorizada. Todo el trabajo de rectificado de hueso se puede realizar con una copiosa irrigación con solución salina fisiológica. Las monedas de titanio se pueden cubrir con un tapón de teflón y una placa ósea maxilofacial de titanio preformada (Medicon® CMS, Tuttlingen, Alemania) fijada con dos tornillos de titanio (Medicon® CMS, Tuttlingen, Alemania) situados en el hueso cortical a modo de estabilizador. El tejido blando se puede recolocar y suturar con Dexon®II, (Sherwood-Davis & Geek, Reino Unido). Tras la cirugía, cada animal puede recibir una inyección s.c. de 20 ml de NaCl calentado a temperatura corporal y una inyección s.c. de 0,02 - 0,05 mg/kg de buprenorfina. También se puede administrar una segunda inyección s.c. de 0,05 mg/kg de Temgesic, como mínimo 3 horas después de la primera/anterior inyección de Temgesic. El estado de salud se puede supervisar durante el período de estudio y los puntos de la intervención se pueden examinar cuidadosamente a diario hasta la total cicatrización de las heridas.

3. *Ensayo de tracción y análisis molecular*

Los implantes se pueden evaluar con un ensayo de tracción ocho semanas después de la cirugía. Tras un período de cicatrización de ocho semanas, se puede practicar la eutanasia a los conejos con la administración i.v. de 1,0 ml de fluanisona/fentanilo, seguida de la administración i.v. de 1 ml/kg de peso corporal de pentobarbital. Inmediatamente después de la eutanasia, se puede practicar una incisión en la tibia a través del tejido blando. La placa de titanio que cubría los implantes queda al descubierto y se puede extraer. Se puede practicar un orificio en el centro de los tapones de teflón con una aguja hueca, y se puede aplicar aire a presión para retirar los tapones y dejar al descubierto el dorso del implante de titanio. Los ensayos de tracción se pueden realizar con una máquina de prueba de materiales Lloyds LRX (Lloyds Instruments Ltd, Segens-Worth, Reino Unido) con una célula de carga calibrada de 100 N. El intervalo de velocidad de la cruceta se puede fijar en 1,0 mm/minuto. La carga se puede aplicar hasta que el implante se afloje y se puede anotar en un gráfico de carga respecto a tiempo.

Tras el desprendimiento del implante, el exudado de la herida del punto del implante se puede recoger para analizar la actividad de la lactato deshidrogenasa. La composición del tejido óseo periimplante se puede caracterizar según la proteína total y la densidad mineral ósea volumétrica (DMOv). La expresión génica de marcadores moleculares relacionados con la formación ósea, resorción e inflamación también se puede evaluar.

Ejemplo 10. Unión covalente de ácido fítico a implantes de titanio utilizando un ligador - Optimización del proceso

El siguiente procedimiento se puede utilizar para optimizar la funcionalización de las superficies de titanio con IP6 a través de enlaces covalentes, obteniendo superficies de titanio recubiertas de IP6 homogéneas de una manera más reproducible.
El protocolo del procedimiento se describe a continuación.

- Activación de superficie de titanio: se utilizó cualquiera de los procedimientos experimentales desarrollados en el ejemplo 3. Después del tratamiento, los implantes se secaron en una corriente de nitrógeno inmediatamente antes de realizar la formación de la monocapa.
- Silanización: esta etapa se realizó utilizando los procedimientos experimentales desarrollados en el ejemplo 1. Sin embargo, la formación de la monocapa autoensamblada APTES se logró en una caja de guantes bajo una atmósfera de nitrógeno seco y usando una solución APTES al 2% (v/v) preparada en tolueno anhidro como disolvente. Se utilizaron contenedores individuales para cada implante (3ml/implante). La reacción se dejó desarrollar durante 24 ha temperatura ambiente. Después, se enjuago bajo flujo de tolueno (bajo atmósfera de N_2), para eliminar el exceso de silano y evitar la polimerización y, fuera de la caja de guantes, se enjuago con acetona y etanol para eliminar el material fisisorbido. Finalmente, se secó a 70°C.
- Unión covalente de IP6: esta etapa se realizó utilizando los procedimientos experimentales desarrollados en el ejemplo 1, optimizado según el siguiente procedimiento:
    1) Sumergir los implantes silanizados en una solución acuosa de EDC 6 mg/ml y IP6 1 mg/ml en viales individuales (3ml/implante). 1 mg IP6 = 1.423 mg IP6Na6.
    2) Añada inmediatamente 3 ml de solución de imidazol 6 mg / ml a pH = 6 a cada vial.
    3) Sonicar 2h @ RT
    4) Enjuagar suavemente con agua para eliminar los materiales no reaccionados.
    5) Secar con N_2.
    6) Almacenar en condiciones secas y frescas (atmósfera de N_2, -20 ° C).

Referencias

Grases, F., P. Sanchis, et al. (2010). "Effect of tetracalcium dimagnesium phytate on bone characteristics in ovariectomized rats." J Med Food 13(6): 1301-1306.

Liu, X. Y., P. K. Chu, et al. (2004). "Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications." Materials Science & Engineering R-Reports 47(3-4): 49-121.

Mills, A. and S. LeHunte (1997). "An overview of semiconductor photocatalysis." Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry 108(1): 1-35.

Miyauchi, M., N. Kieda, et al. (2002). "Reversible wettability control of TiO2 surface by light irradiation." Surface Science 511(1-3): 401-407.

Nakamura, M., L. Sirghi, et al. (2002). "Study on hydrophilic property of hydro-oxygenated amorphous TiOx : OH thin films." Surface Science 507: 778-782.

Petzold, C., S. P. Lyngstadaas, et al. (2008). "UV-induced chemical coating of titanium surfaces with eicosapentaenoic acid." Journal of Materials Chemistry 18(45): 5502-5510.

Wang, R., K. Hashimoto, et al. (1998). "Photogeneration of highly amphiphilic TiO2 surfaces." Advanced Materials 10(2): 135-+.

Wu, K. R., J. J. Wang, et al. (2006). "Deposition of graded TiO2 films featured both hydrophobic and photo-induced hydrophilic properties." Applied Surface Science 252(16): 5829-5838.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Laboratorios Sanifit NuMat Biomedical

<120> "IMPLANTE BIOCOMPATIBLE"

<130> PCT1737.8

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de mGAPDH

<400> 1
acccagaaga ctgtggatgg 20

<210> 2
<211> 20

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de mGAPDH

<400> 2
cagattgggg gtaggaacac 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de m18S rRNA

<400> 3
gtaacccgtt gaaccccatt 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de m18S rRNA

<400> 4
ccatccaatc ggtagtagcg 20

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de mTRAP

<400> 5
gcgaccattg ttagccacat acg 23

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de mTRAP

<400> 6
cgttgatgtc gcacagaggg at 22

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de mCalcR

<400> 7
tggtgcggcg ggatcctata agt 23

<210> 8

<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de mCalcR

<400> 8
agcgtaggcg ttgctcgtcg 20

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de mCFMS

<400> 9
tggatgcctg tgaatggctc tg 22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de mCFMS

<400> 10
gtgggtgtca ttccaaacct gc 22

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de mCtsk

<400> 11
agcagaacgg aggcattgac tc 22

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de mCtsk

<400> 12
tttagctgcc tttgccgtgg c 21

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de mMMP-9

<400> 13
gctgactacg ataaggacgg ca 22

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de mMMP-9

<400> 14
gcggccctca aagatgaacg g 21

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de mCar2

<400> 15
ctctgctgga atgtgtgacc tg 22

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de mCar2

<400> 16
ctgagctgga cgccagttgt c 21

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de mH+ATPase

<400> 17
acggtgatgt cacagcagac gt 22

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de mH+ATPase

<400> 18
cctctggata gagcctgccg ca 22

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de hGAPDH

<400> 19
tgcaccacca actgcttagc 20

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de hGAPDH

<400> 20
ggcatggact gtggtcatga g 21

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de hbeta-actin

<400> 21
aagggacttc ctgtaacaat gca 23

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de hbeta-actin

<400> 22
ctggaacggt gaaggtgaca 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de hRunx2

<400> 23
ctgtgctcgg tgctgccctc 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de hRunx2

<400> 24
cgttacccgc catgacagta 20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de hCol1A

<400> 25

cctgacgcac ggccaagagg 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de hCol1A

<400> 26
ggcagggctc gggtttccac 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de hALP

<400> 27
ccgctatcct ggctccgtgc 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de hALP

<400> 28
ggtgggctgg cagtggtcag 20

<210> 29
<211> 16
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo usado para la amplificación de hOC

<400> 29
gaagcccagc ggtgca 16

<210> 30
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso usado para la amplificación de hOC

<400> 30
cactacctcg ctgccctcc 19

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer directo de amplificación de osteocalcina marcador osteoblasto

<400> 31
ccgggagcag tgtgagctta 20

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Primer inverso de amplificación de osteocalcina marcador osteoblasto

<400> 32
tagatgcgtt tgtaggcggt c 21

REIVINDICACIONES

1. Un implante biocompatible que comprende uno o varios metales, aleaciones metálicas, óxidos metálicos o una combinación de estos elementos, en el que se forma un enlace covalente, con un ligador, entre un compuesto seleccionado del grupo formado por un inositol fosfato (IP), un ester de un IP, una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de dichas sustancias, y por lo menos una parte de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de dicho implante biocompatible.

2. Un implante biocompatible según la reivindicación 1, en el que el IP incluye 1, 2, 3, 4, 5 o 6 grupos fosfato.

3. Un implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se une un ligador a dicha superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico y a dicho IP, ester de un IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de dichas sustancias.

4. Un implante biocompatible según la reivindicación 3, en el que dicho ligador se selecciona del grupo formado por anhídridos, alcoholes, ácidos, aminas, epoxis, isocianatos, silanos, grupos halogenados y grupos polimerizables.

5. Un implante biocompatible según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los metales, aleaciones metálicas u óxidos metálicos se seleccionan del grupo formado por titanio, una aleación o un óxido de este elemento; circonio, una aleación o un óxido de este elemento; tantalio, una aleación o un óxido de este elemento; hafnio, una aleación o un óxido de este elemento, niobio, una aleación o un óxido de este elemento; una aleación de cromo-vanadio y acero inoxidable.

6. El implante biocompatible según la reivindicación 5 donde el implante es un andamiaje de óxido metálico que comprende óxido de titanio.

7. Un implante biocompatible según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el implante se selecciona del grupo formado por un implante quirúrgico, un implante ortopédico, un implante dental, un dispositivo de fijación ortopédico, una prótesis ortopédica articular, un disco protésico para fijación vertebral o un material de injerto.

8. Un implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que otras biomoléculas están presentes en una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico del implante, y dichas biomoléculas se seleccionan del grupo formado por biomoléculas naturales, biomoléculas sintéticas y biomoléculas recombinantes seleccionadas de la lista que consiste en: bioadhesivos, factores de adhesión celular, biopolímeros, proteínas sanguíneas, enzimas, biomoléculas y proteínas de la matriz extracelular, hormonas y factores de crecimiento, ácidos nucleicos (DNA y RNA), receptores, biomoléculas sintéticas, vitaminas, fármacos, bifosfonatos, iones biológicamente activos, fluoruro y biomoléculas marcadoras.

9. Un método de fabricación de un implante biocompatible con un ligador según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las siguientes etapas:
   a) pretratamiento químico de una superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico de un implante,
   b) entrada en contacto y reacción de un IP, un ester de un IP y/o una sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien una combinación de dichas sustancias, con dicha superficie pretratada químicamente de la etapa a) formando un enlace covalente con la superficie metálica, de una aleación metálica o de un óxido metálico,
   donde antes del paso b), se lleva a cabo una etapa que consiste en la entrada en contacto y reacción de un ligador con la superficie pretratada químicamente obtenida en la etapa a), y en donde en la etapa b) el IP reacciona con dicho ligador.

10. Un método según la reivindicación 9, en el que la etapa a) se realiza mediante un tratamiento de pasivación, un tratamiento con solución piraña o un tratamiento con una o varias soluciones alcalinas.

11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde dicho IP, ester de IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de dichas sustancias, se activa antes de su adicción a la superficie en el paso b).

12. Un método según la reivindicación 11, en el que dicha activación se realiza mediante la adición de un reticulante de carbodiimida a dicho IP, ester de IP, sal de estas sustancias aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o bien combinación de dichas sustancias.

13. Un implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la modulación o mejora de la oseointegración.

14. Un implante biocompatible según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en medicina regenerativa, preferiblemente para sustituir tejido óseo o restaurar una función corporal de un animal vertebrado, en particular de un mamífero, como por ejemplo un humano.

Figura 1a)

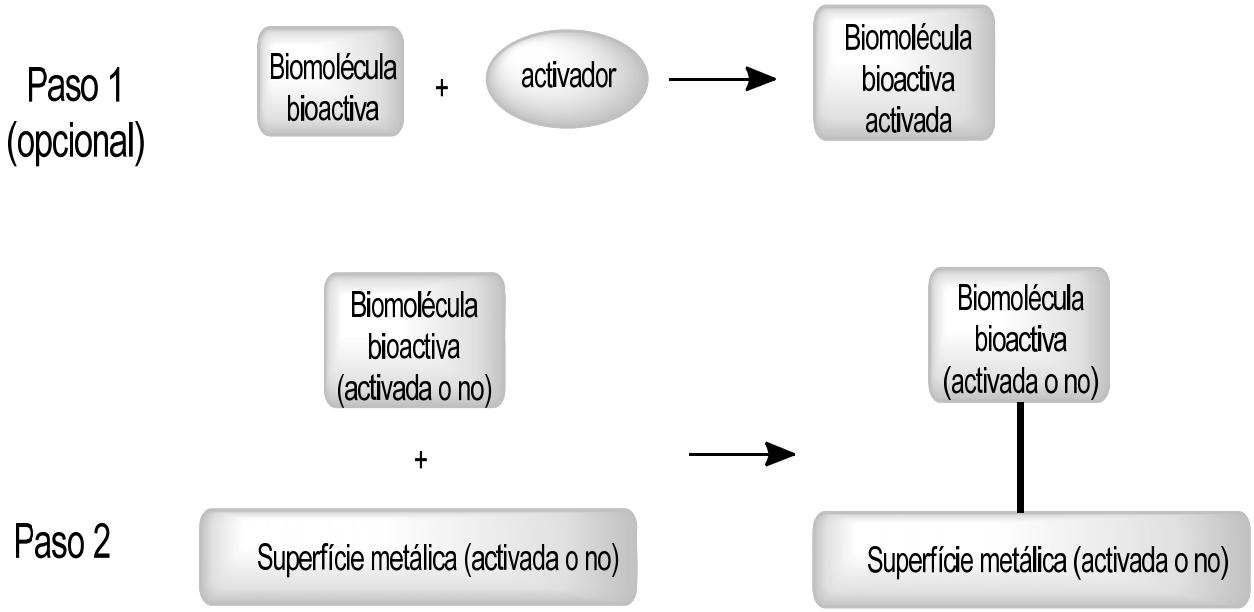


Figura 1b)

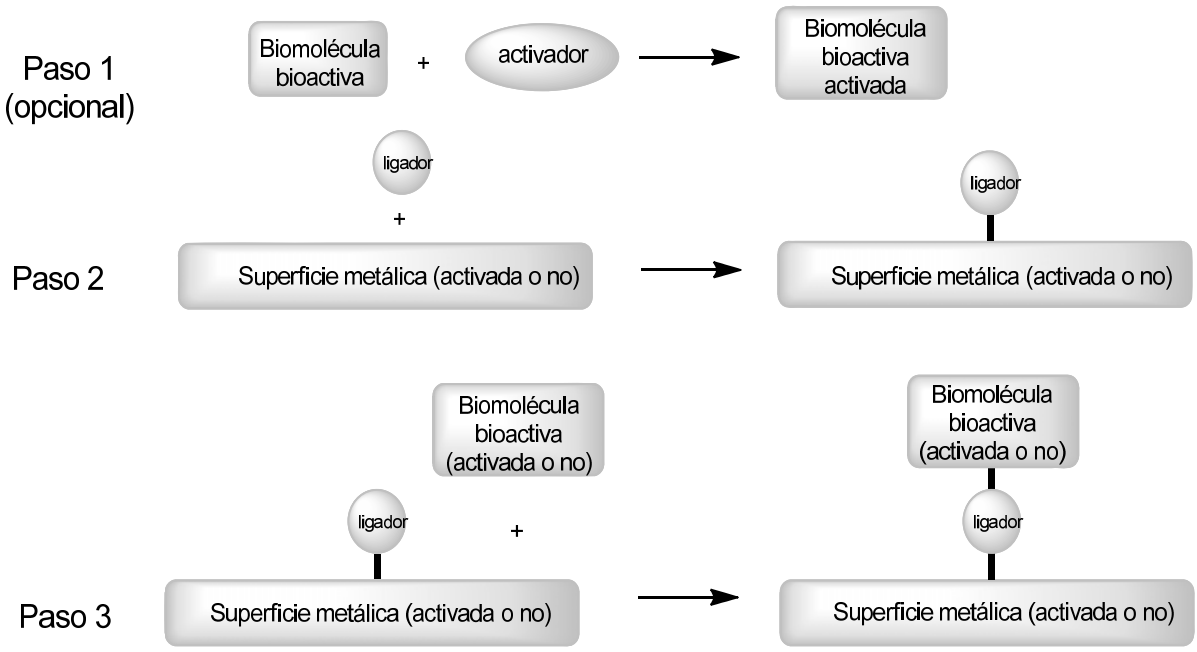


Figura 2

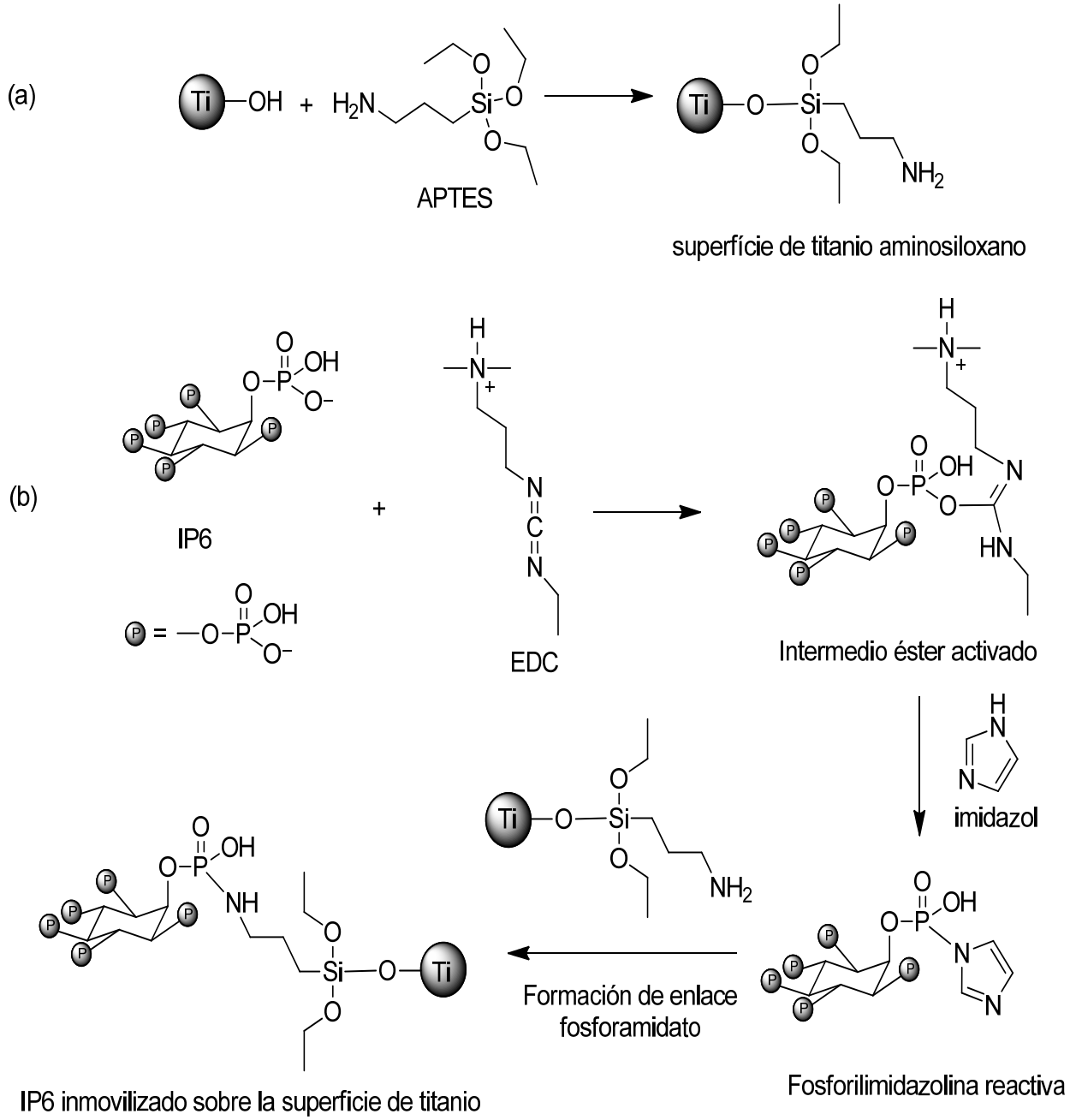

(a)
Ti
OH
+
H_2N
Si
O
APTES
NH_2
superfície de titanio aminosiloxano
(b)
IP6
P = —O—P(=O)(OH)—O⁻
+
EDC
Intermedio éster activado
imidazol
Formación de enlace fosforamidato
Fosforilimidazolina reactiva
NH
IP6 inmovilizado sobre la superficie de titanio

Figura 3

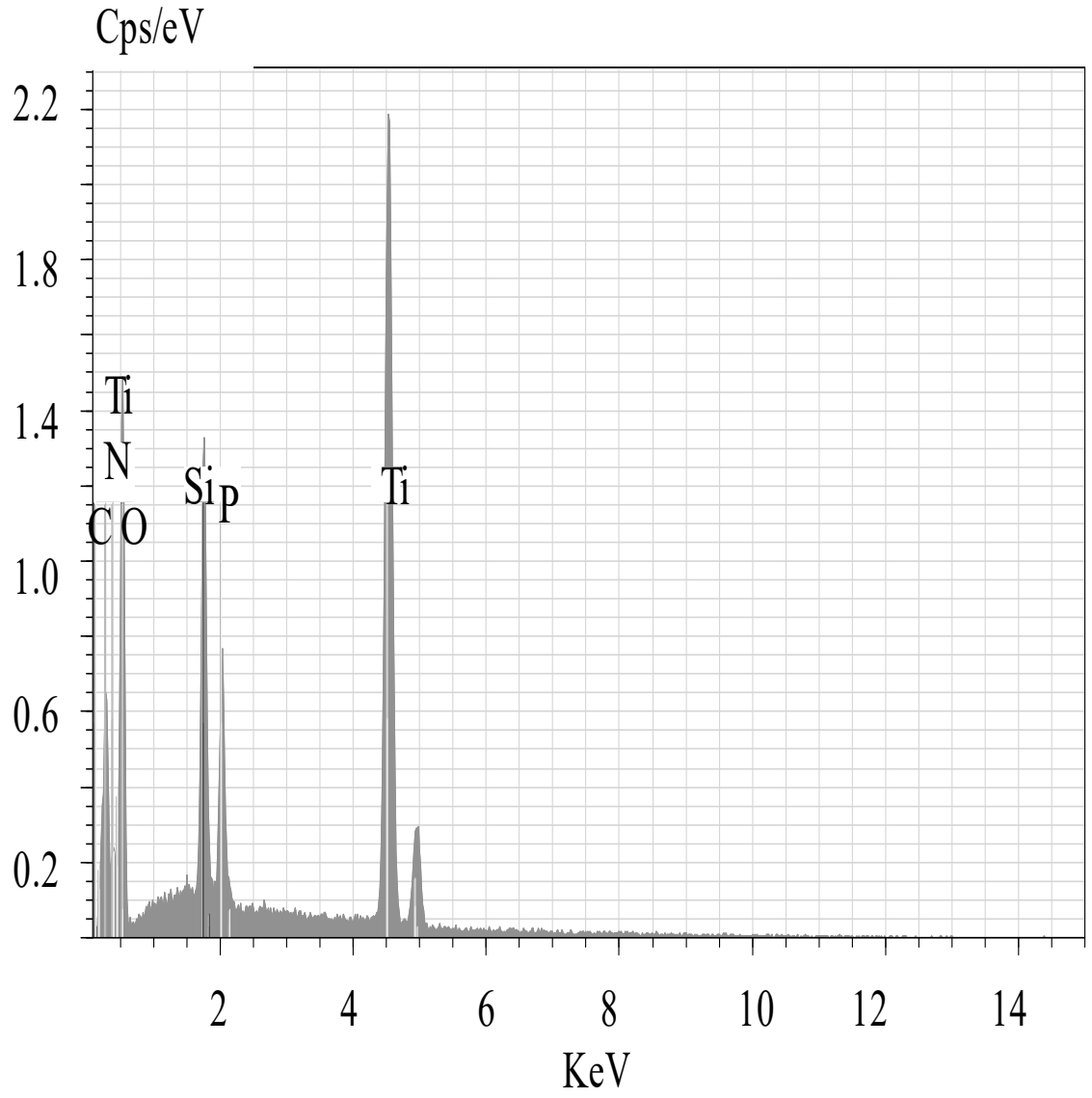


Figura 4

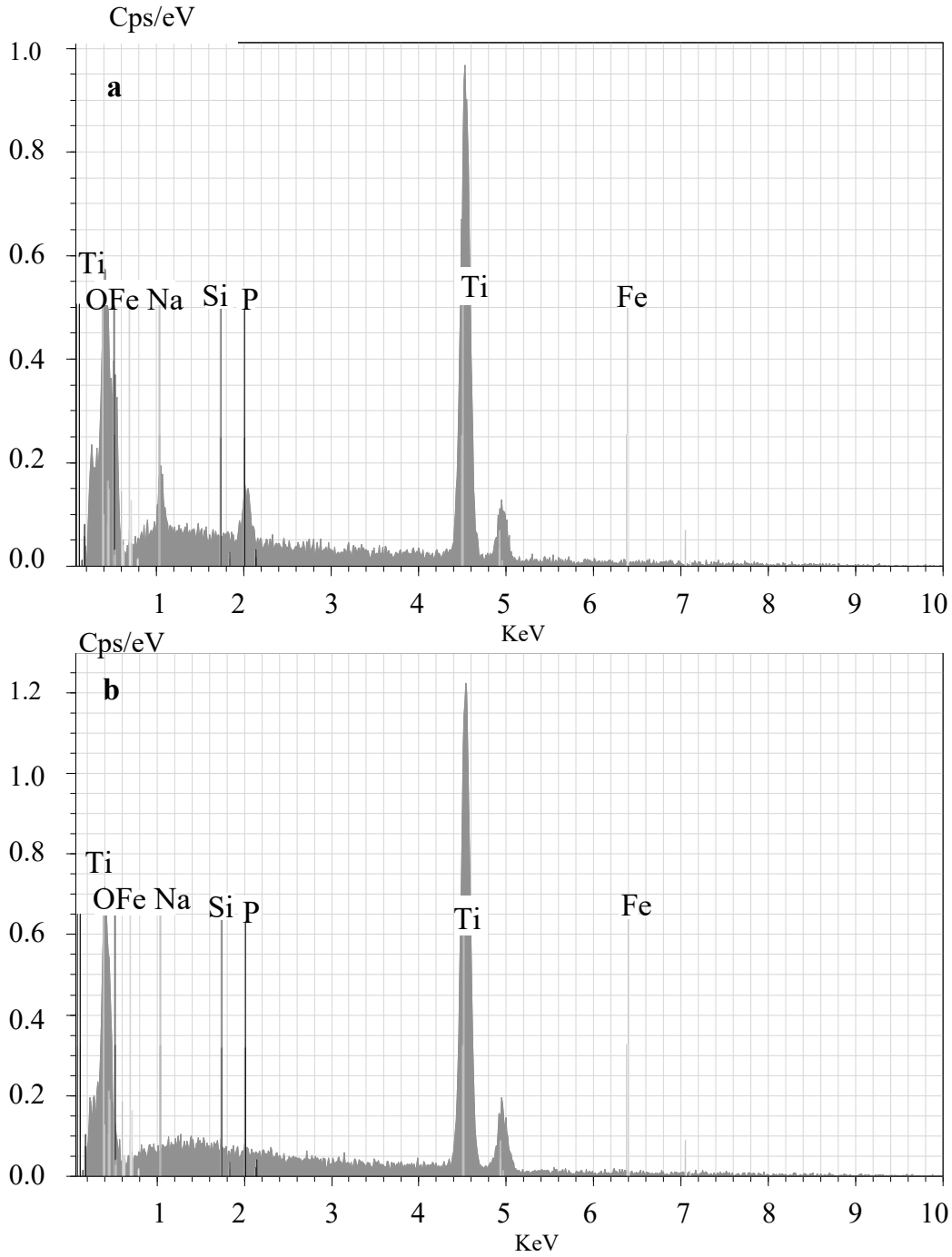


Figura 5

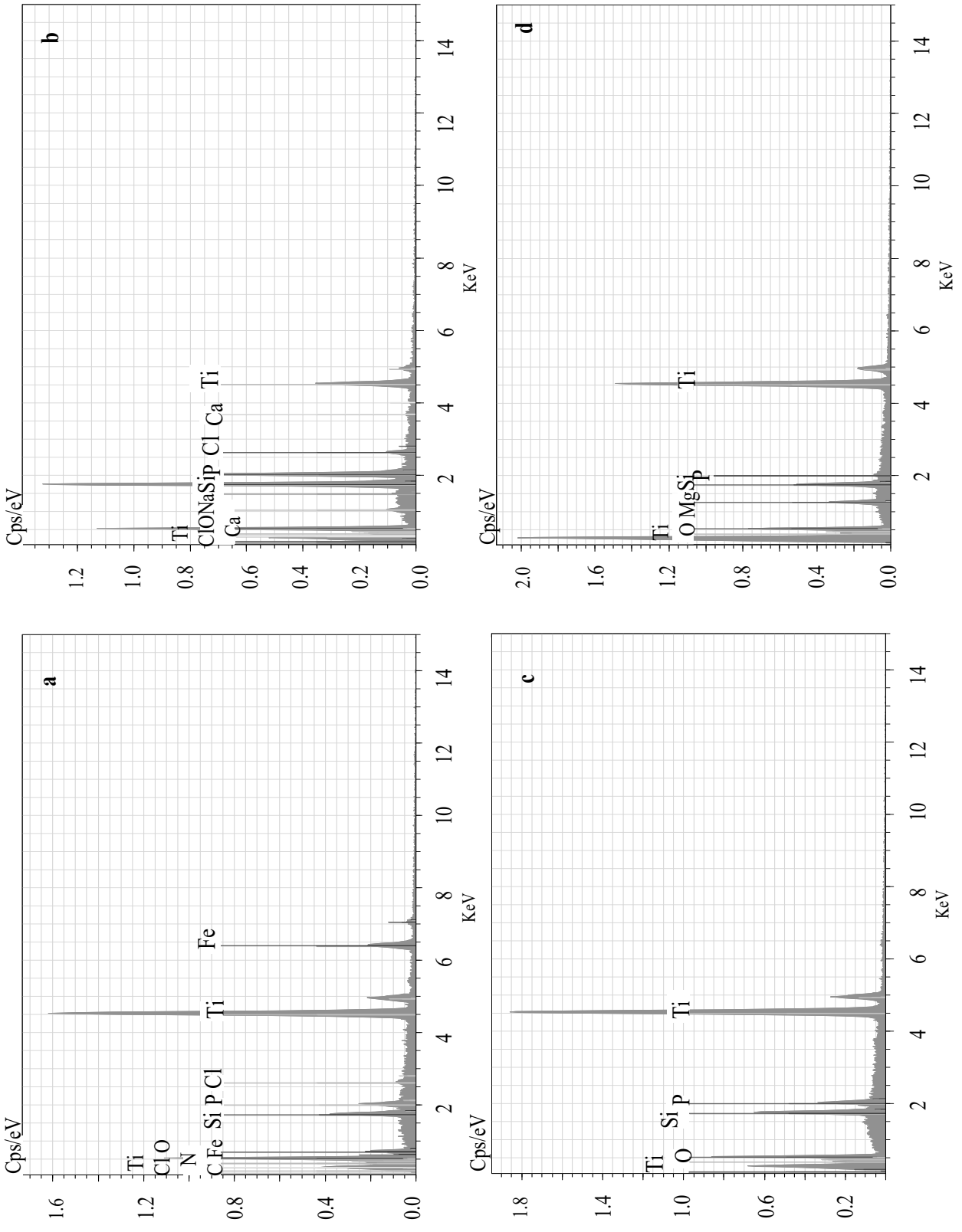

a
Cps/eV
Ti
Cl O
N
C Fe Si P Cl
Ti
Fe
KeV
b
Cps/eV
Ti
Cl O Na Si P Cl Ca Ti
Ca
KeV
c
Cps/eV
Ti
O
Si P
Ti
KeV
d
Cps/eV
Ti
O Mg Si P
Ti
KeV

Figura 6

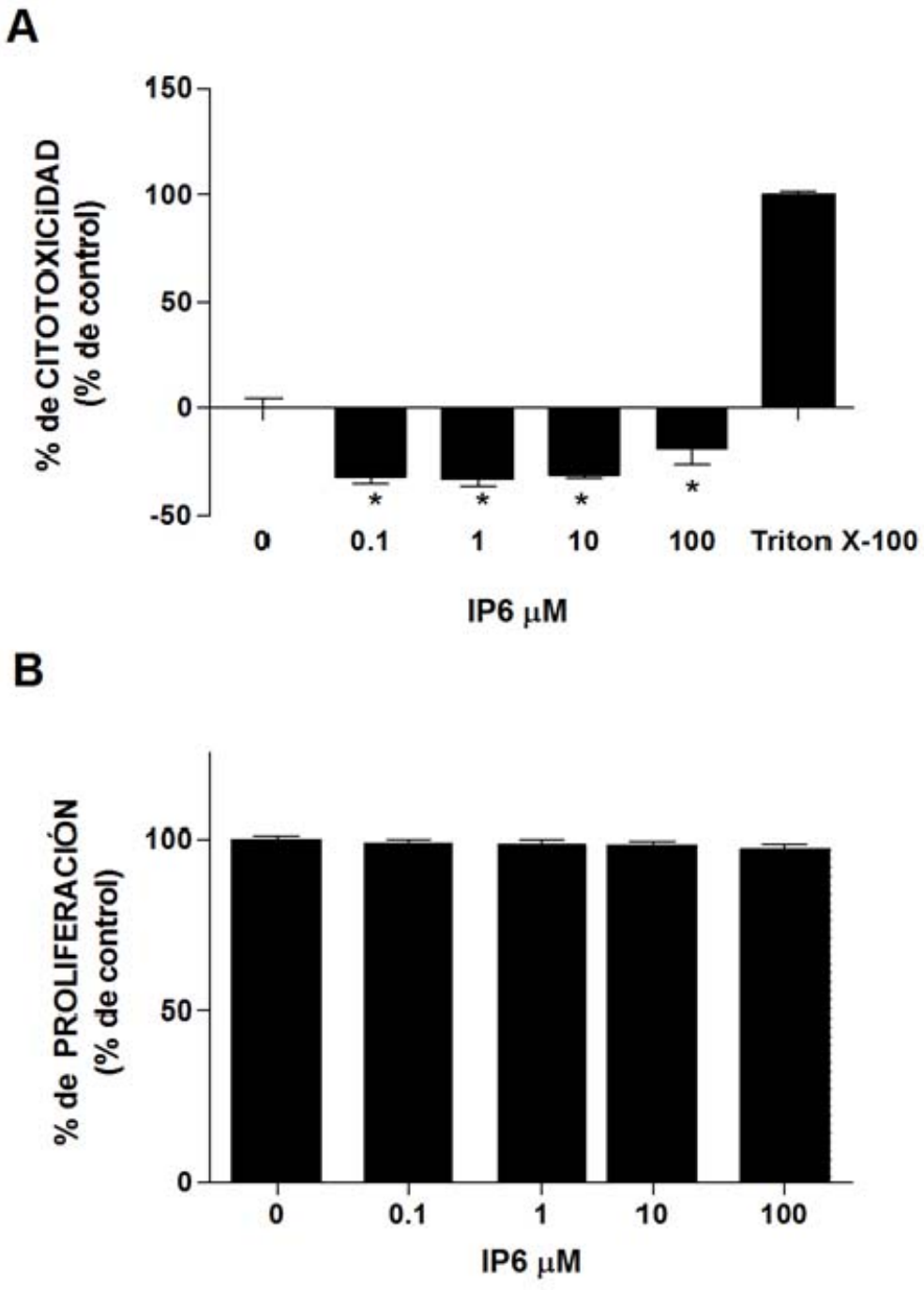

A
% de CITOTOXICIDAD
(% de control)
150
100
50
0
-50
*
*
*
*
0
0.1
1
10
100
Triton X-100
IP6 μM
B
% de PROLIFERACIÓN
(% de control)
100
50
0
0
0.1
1
10
100
IP6 μM

Figura 7

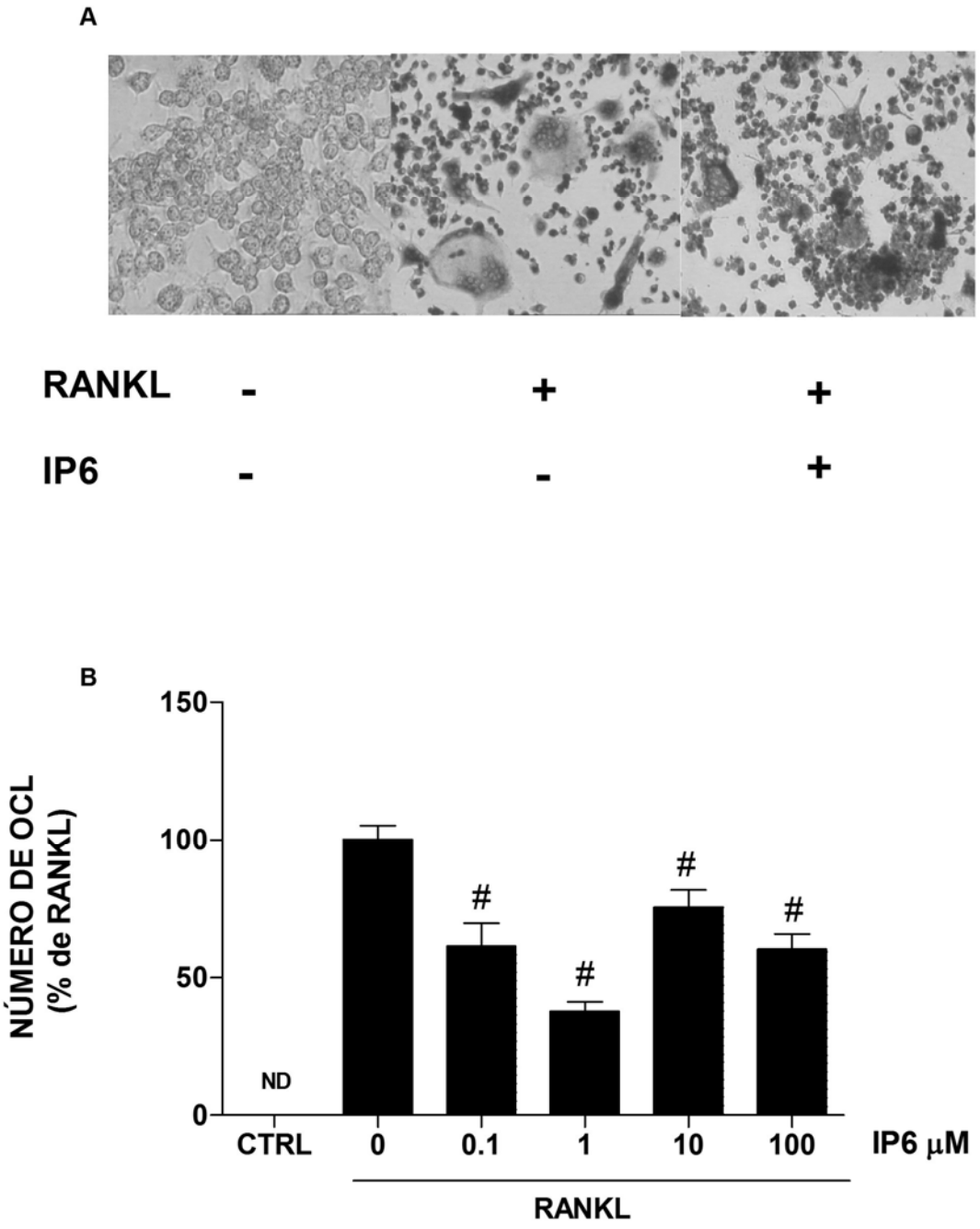

A
RANKL - + +
IP6 - - +
B
NÚMERO DE OCL (% de RANKL)
150
100
50
0
ND
#
CTRL
0
0.1
1
10
100
IP6 μM
RANKL

Figura 8

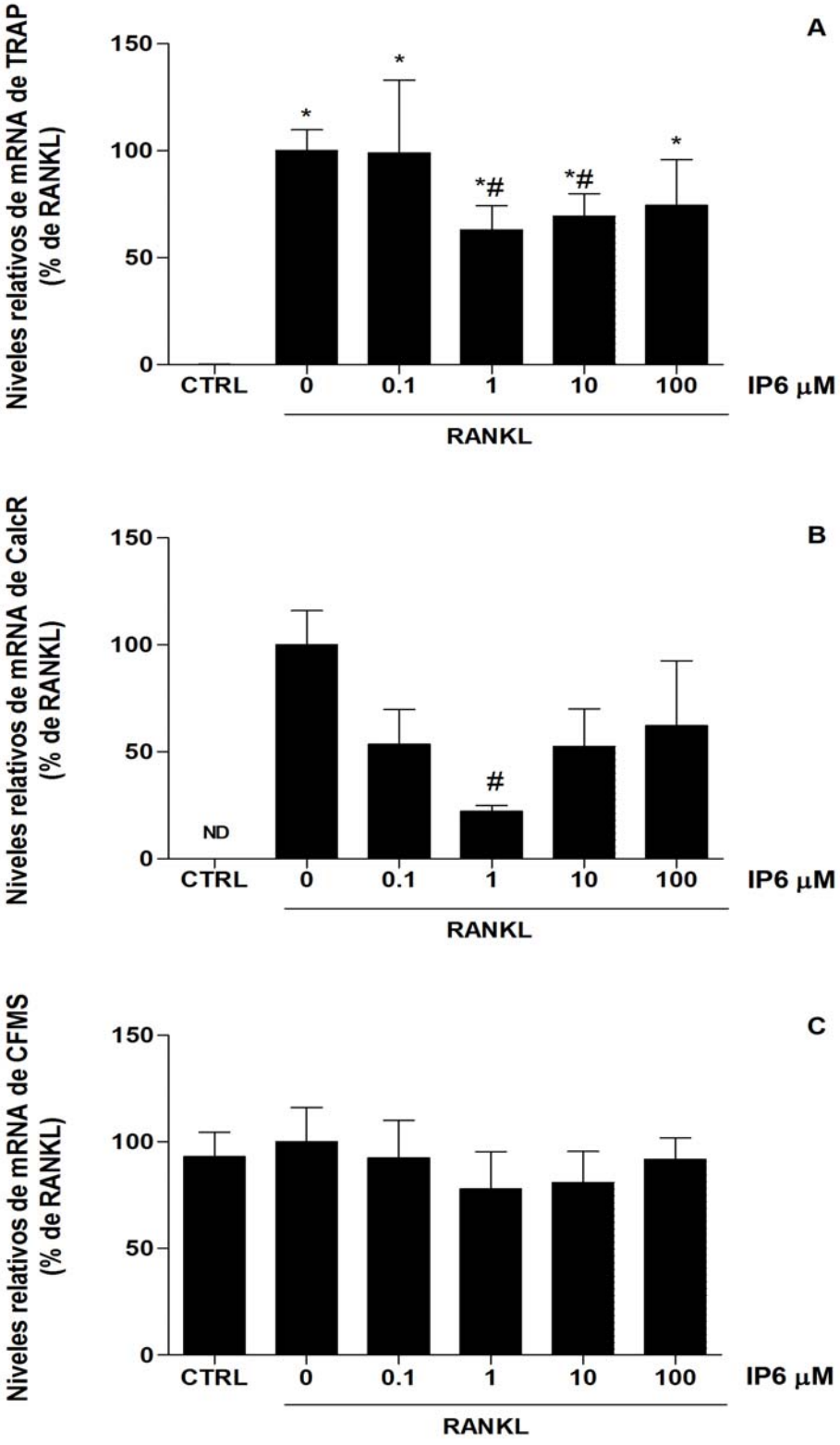

A
Niveles relativos de mRNA de TRAP (% de RANKL)
150
100
50
0
*
*
*#
*#
*
CTRL
0
0.1
1
10
100
IP6 µM
RANKL
B
Niveles relativos de mRNA de CalcR (% de RANKL)
150
100
50
0
ND
#
CTRL
0
0.1
1
10
100
IP6 µM
RANKL
C
Niveles relativos de mRNA de CFMS (% de RANKL)
150
100
50
0
CTRL
0
0.1
1
10
100
IP6 µM
RANKL

Figura 9

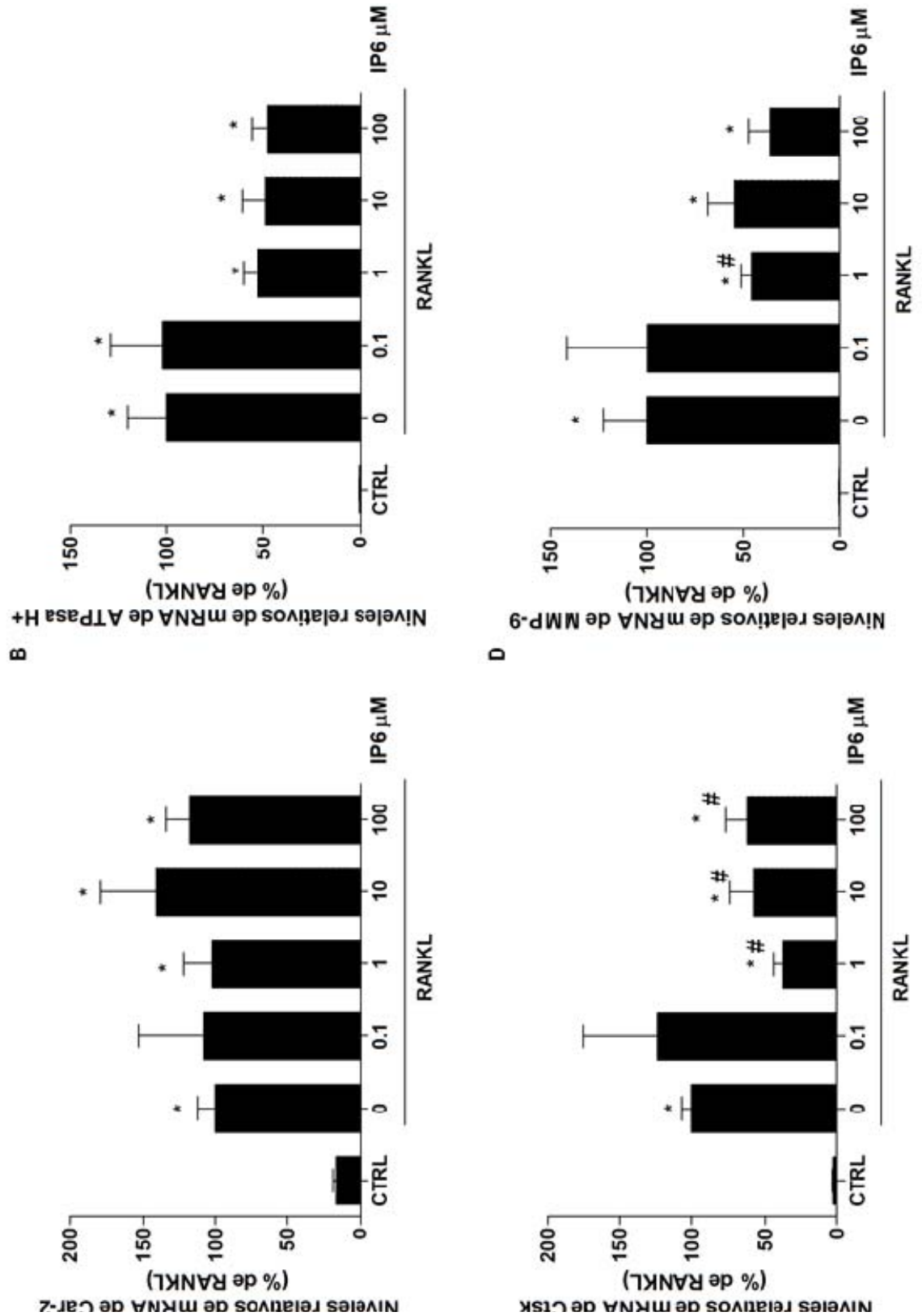

B
Niveles relativos de mRNA de ATPasa H+
(% de RANKL)
150
100
50
0
CTRL
0
0.1
1
10
100
IP6 µM
RANKL
D
Niveles relativos de mRNA de MMP-9
(% de RANKL)
150
100
50
0
CTRL
0
0.1
1
10
100
IP6 µM
RANKL
Niveles relativos de mRNA de Car-2
(% de RANKL)
200
150
100
50
0
CTRL
0
0.1
1
10
100
IP6 µM
RANKL
Niveles relativos de mRNA de Ctsk
(% de RANKL)
200
150
100
50
0
CTRL
0
0.1
1
10
100
IP6 µM
RANKL

Figura 10

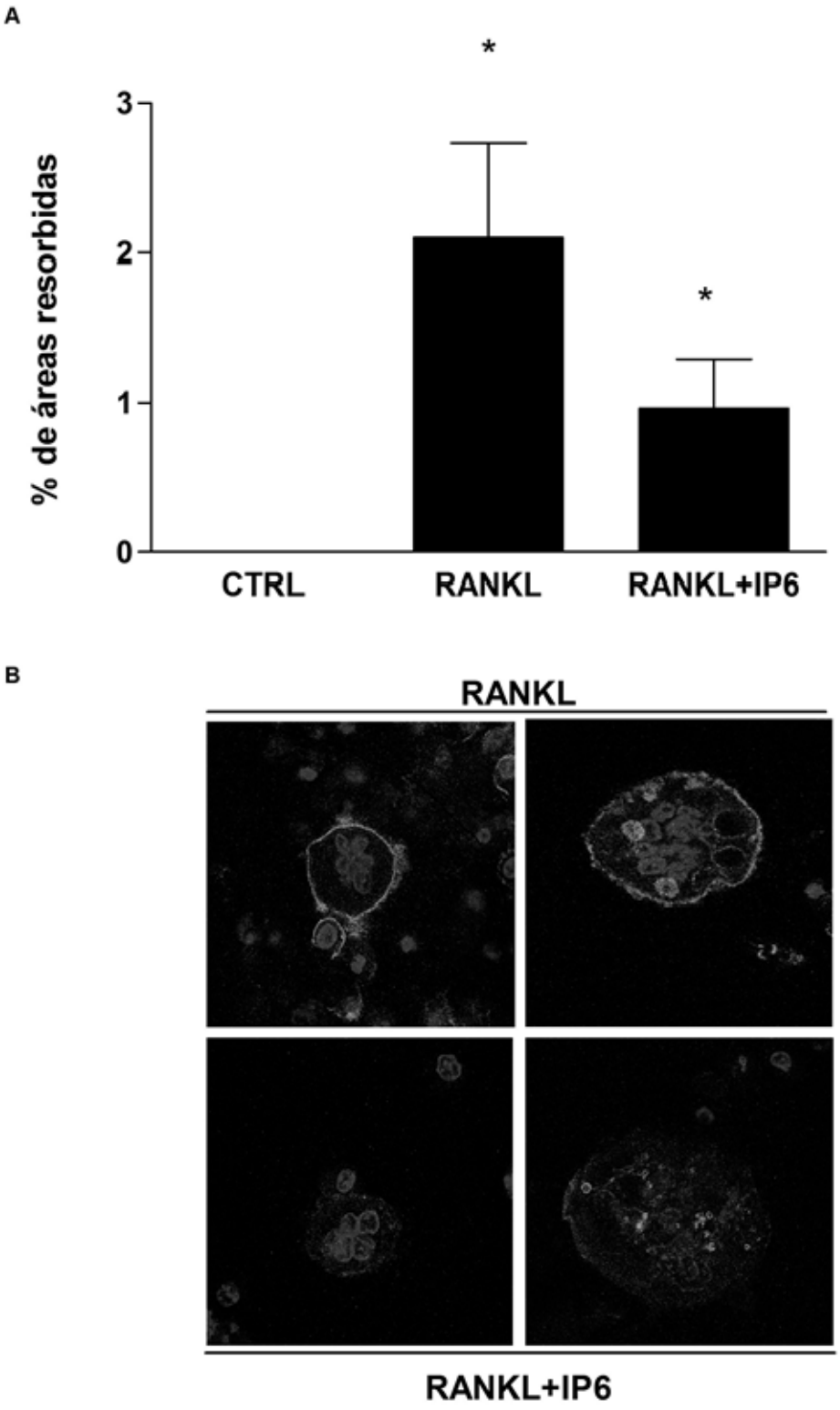

A
*
*
3
2
1
0
% de áreas resorbidas
CTRL
RANKL
RANKL+IP6
B
RANKL
RANKL+IP6

Figura 11

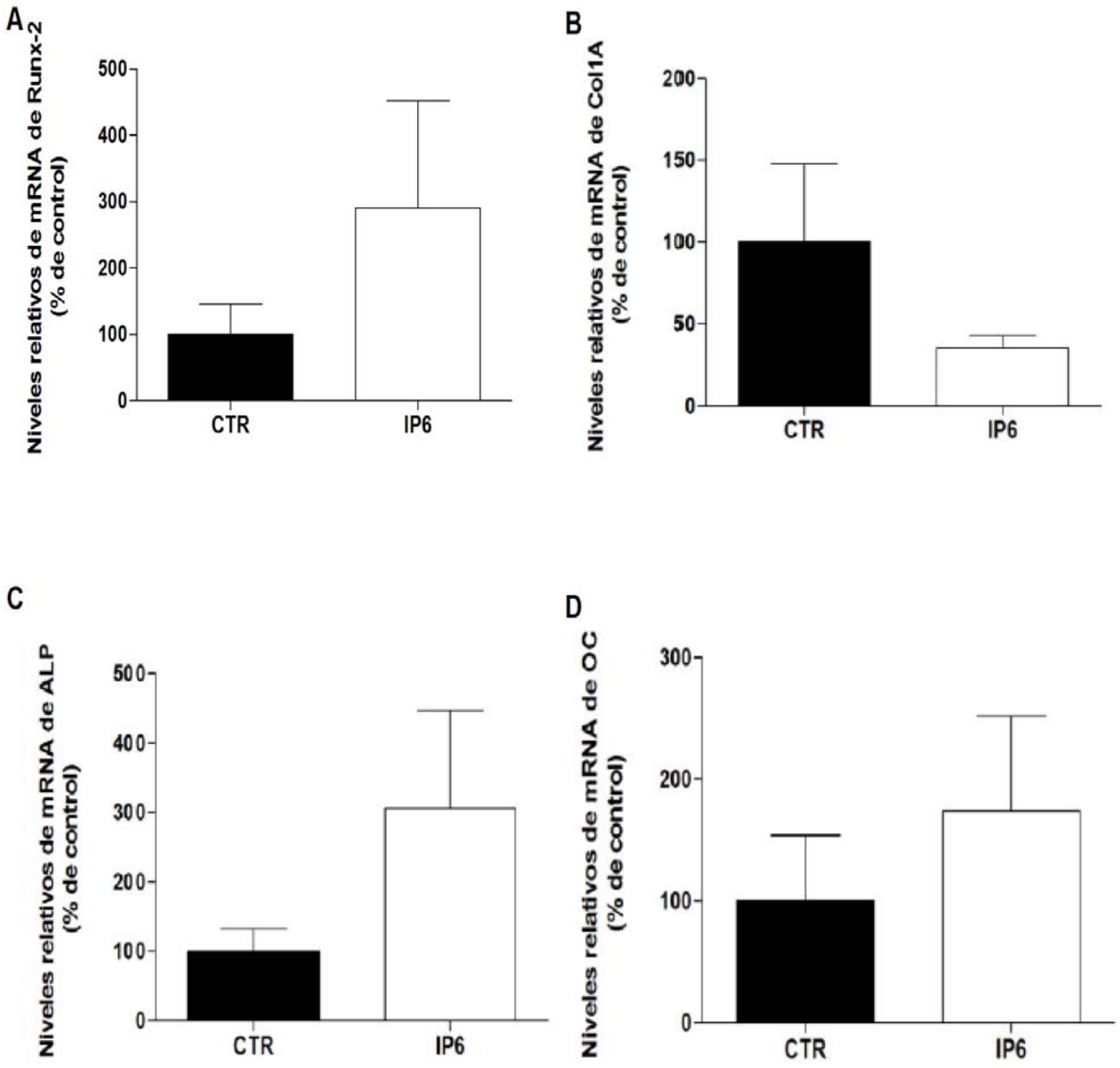

A
Niveles relativos de mRNA de Runx-2 (% de control)
500
400
300
200
100
0
CTR
IP6
B
Niveles relativos de mRNA de Col1A (% de control)
200
150
100
50
0
CTR
IP6
C
Niveles relativos de mRNA de ALP (% de control)
500
400
300
200
100
0
CTR
IP6
D
Niveles relativos de mRNA de OC (% de control)
300
200
100
0
CTR
IP6

Figura 12

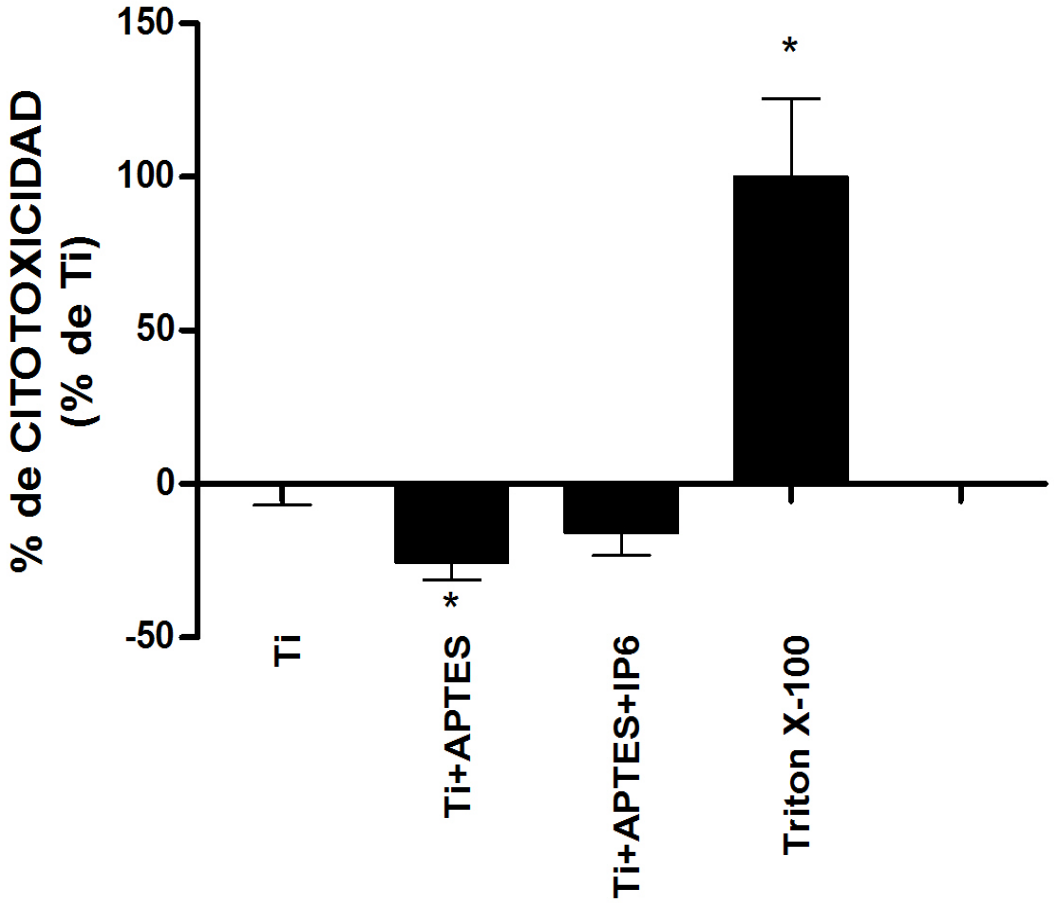
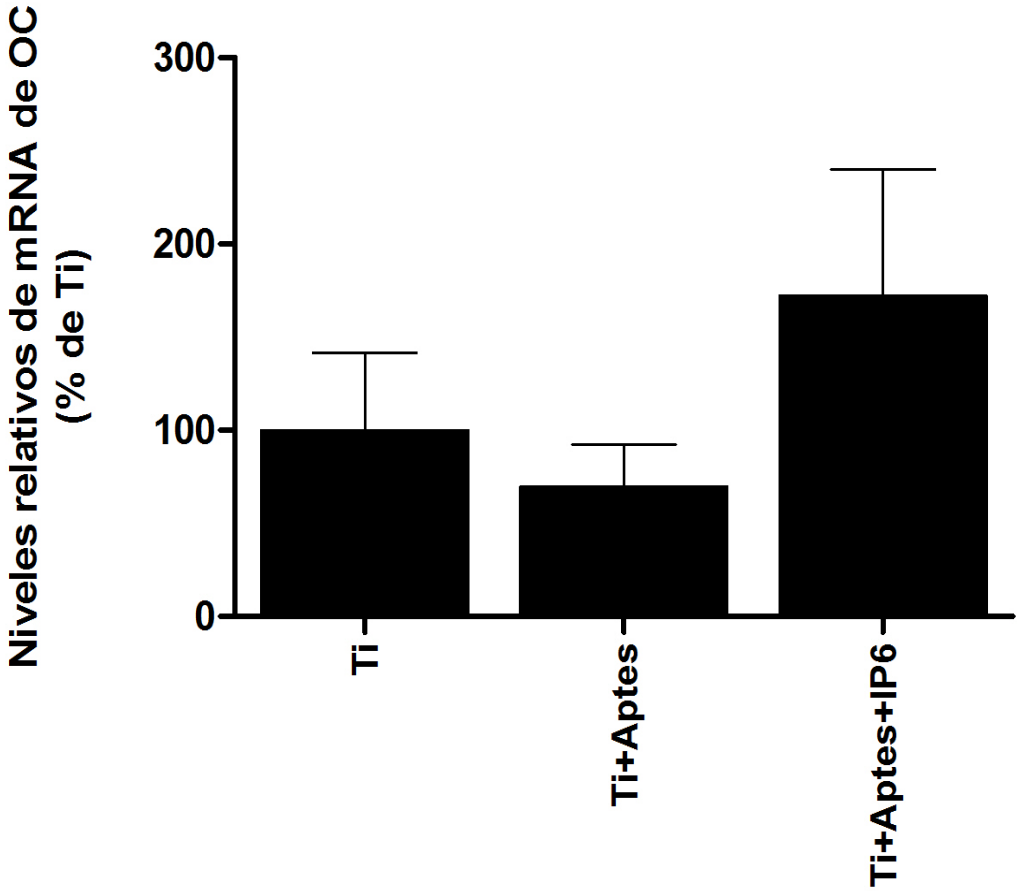

% de CITOTOXICIDAD
(% de Ti)
150
100
50
0
-50
*
*
Ti
Ti+APTES
Ti+APTES+IP6
Triton X-100

Figura 13


Niveles relativos de mRNA de OC
(% de Ti)
300
200
100
0
Ti
Ti+Aptes
Ti+Aptes+IP6