

# ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901921043A1

Publication Date

20120901

Applicant

DENTAL TECH S.R.L.

Title

IMPIANTO DENTALE CON SUPERFICIE NANOSTRUTTURATA E  
PROCEDIMENTO PER IL SUO OTTENIMENTO

I0144127/GL

TITOLO: IMPIANTO DENTALE CON SUPERFICIE  
NANOSTRUTTURATA E PROCEDIMENTO PER IL SUO OTTENIMENTO  
RICHIEDENTE: DENTAL TECH

5

**Descrizione**Campo dell'invenzione

La presente invenzione mette a disposizione materiali e metodi per la preparazione di nanotubi a base di biossido di titanio come rivestimento per  
10 protesi biomedicali osteointegrate, in particolare per impianti dentali. Tali rivestimenti, realizzati con metodiche elettrochimiche e chimiche, hanno lo scopo di favorire l'osteointegrazione degli impianti endossei.

15

Stato dell'arte

Il titanio e le sue leghe sono materiali largamente impiegati in implantologia grazie alle loro caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità.

20

Quando esposto all'ossigeno, il titanio tende ad ossidarsi incrementando le sue caratteristiche che ne favoriscono l'osteointegrazione. Tra le forme allotropiche di biossido di titanio particolarmente utilizzate in implantologia, vi è l'anatase, che

25

viene generalmente preparato come sospensione

colloidale utilizzata per ricoprire viti e impianti. Tale rivestimento è infatti in grado di modulare l'espressione genica e i processi traslazionali degli osteoblasti ed ha un bassissimo potenziale di  
5 colonizzazione batterica.

L'osteointegrazione è un processo per il quale il materiale innestato determina un'attivazione del tessuto osseo nel quale è stato inserito, tale da determinare un'adesione del tessuto osseo  
10 all'innesto. Il processo di osteointegrazione è estremamente complesso e non completamente chiarito. In esso intervengono meccanismi di controllo immunogenico (riconoscimento del self) tipico di tutti i processi che prevedono l'utilizzo di  
15 trapianti, meccanismi di osteoconduzione (processo per il quale il materiale innestato rappresenta un supporto alla neoproduzione di osso) e di osteoinduzione (processo per il quale il materiale innestato determina uno o più segnali molecolari che  
20 inducono la neosintesi di osso). Il processo di osteointegrazione può essere considerato ultimato in circa 60 giorni, corrispondenti al tempo di consolidamento delle fratture.

Per quanto riguarda gli impianti endoossei, un  
25 ruolo importante viene rivestito dall'effetto del

materiale di cui sono composti e dal design dell'impianto stesso. Entrambi i fattori infatti influiscono in vario grado sul processo di osteointegrazione.

5        Il titanio rappresenta ad oggi il materiale di prima scelta per le protesi dentali ed ortopediche in quanto unisce alle eccellenti proprietà meccaniche anche una elevata osteointegrazione.

Per quanto attiene il design dell'impianto,  
10 viene normalmente preso in considerazione: (1) un macrodesign, (2) un minidesign, (3) un microdesign e (4) un nanodesign.

Il primo è il disegno macroscopico dell'impianto. Volendo fare riferimento agli impianti  
15 dentali, esistono impianti di varia forma, per esempio cilindrici o conici.

Il secondo è dato dalle caratteristiche del disegno delle spire, dalla forma degli angoli delle spire (che possono essere smussati o taglienti) ed è  
20 dell'ordine dei millimetri.

Il terzo è dato dalle caratteristiche della superficie che per esempio può essere levigata o irruvidita. A questo fine esistono varie metodiche che determinano differenze nella dimensione dei

micropori che vengono creati alla superficie dell'impianto.

Infine possiamo parlare di nanodesign: questo corrisponde all'organizzazione molecolare sulla  
5 superficie dell'impianto. Attualmente gli impianti sono composti di titanio che all'aria si ossida in biossido di titanio con una distribuzione stocastica delle due forme cristalline, rutilo ed anatase. Studi preliminari reperibili in letteratura dimostrano la  
10 possibilità di produrre superfici completamente rivestite di anatase, cosa che esalta la proprietà osteointegrativa propria del titanio.

Diversi autori concordano che la nano-rugosità prodotta sulla superficie degli impianti abbia un  
15 ruolo fondamentale nel determinarne la loro osteointegrazione. Una review sull'argomento è stata pubblicata da A. Wennerberg, T. Abrechtsson, The Int. Journal of Oral & Maxillofacial Implants p. 63-74 Vol. 25, N.1, 2010, dove l'analisi della nano-  
20 rugosità degli impianti più largamente utilizzati (TiUnite, SLActive, Nanotite e Ossospeed) rivela in tutti i casi l'assenza di strutture nanometriche regolari e la presenza di superfici con rugosità variabili.

Oltre a queste caratteristiche superficiali ve  
ne sono altre estremamente importanti per  
l'osteointegrazione. Alcuni studi, infatti, hanno  
dimostrato che rivestendo le superfici degli impianti  
5 con dei "nanotubi di titanio" se ne incrementa  
notevolmente la biocompatibilità e che tale affinità  
cellulare è strettamente correlata al diametro delle  
nanostrutture, specialmente nella proliferazione  
degli osteoblasti e nei processi di mineralizzazione.  
10 In questi studi le strutture nano-tubolari vengono  
realizzate attraverso processi di ossidazione  
elettrochimica in soluzione acquosa, in presenza di  
acido acetico o fosforico e acido fluoridrico con un  
sistema a tre elettrodi che opera con controllo  
15 potenziostatico.

#### Sommario dell'invenzione

Un oggetto è quello di mettere a disposizione  
dispositivi implantari in titanio che associno alle  
proprietà osteointegrative un'attività antimicrobica,  
20 contribuendo così a prevenire fenomeni infettivi  
spesso causa di rigetto dell'impianto.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione sono  
impianti dentali, tipicamente viti per impianto,  
dotati di elevata osteointegrazione e preferibilmente  
25 di attività anti microbica.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è quello di mettere a disposizione un procedimento per realizzare nanotubi di titanio diossido caricati con una molecola ad attività antimicrobica su un dispositivo  
5 implantare.

Il problema che sta alla base della presente invenzione è quindi quello di ottenere i suddetti oggetti.

Tale problema è risolto da dispositivi  
10 implantari e da un procedimento per la loro produzione, come delineati nelle annesse rivendicazioni, le cui definizioni formano parte integrante della presente descrizione.

15 Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'invenzione risulteranno maggiormente dalla descrizione di alcuni esempi di realizzazione, fatta qui di seguito a titolo indicativo e non limitativo.

#### Breve descrizione delle figure

20 Figura 1 rappresenta schematicamente un dispositivo di anodizzazione per la formazione di nanotubi su titanio;

Figura 2 mostra l'andamento tipico delle correnti elettriche registrate durante i processi di  
25 anodizzazione nei diversi solventi DMSO, NMF o H<sub>2</sub>O;

Figura 3 rappresenta un'immagine SEM di una superficie di titanio che presenta nano tubi di  $\text{TiO}_2$  realizzati via anodizzazione in acqua;

Figura 4 rappresenta un'immagine SEM di una  
5 superficie di titanio che presenta nanotubi di  $\text{TiO}_2$  realizzati via anodizzazione in DMSO;

Figura 5 riporta un grafico con la comparazione fra geni espressi a 15 giorni dalle cellule coltivate sulle superfici con nanotubi e gli stessi geni  
10 derivati da cellule coltivate su titanio levigato;

Figura 6 riporta un grafico con la comparazione fra geni espressi a 30 giorni dalle cellule coltivate sulle superfici con nanotubi e gli stessi geni derivati da cellule coltivate su titanio levigato.

15 Descrizione dettagliata dell'invenzione

L'invenzione consiste nella realizzazione di strutture nanotubolari di diossido di titanio su impianti endoossei in titanio o in leghe metalliche contenenti titanio attraverso processi di  
20 anodizzazione con un semplice alimentatore che opera con due sistemi elettrodici in solventi di tipo organico o acquoso, in particolare in dimetil solfossido (DMSO), N-metilformammide (NMF) e in acqua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e nella produzione di strutture superficiali  
25 che favoriscono il processo di osteointegrazione.

All'interno della struttura nanotubolare vengono poi inserite specie ioniche ad attività antimicrobica come gli ioni argento monovalente ( $\text{Ag}^+$ ), preferibilmente adsorbite su nanoparticelle di biossido di titanio delle dimensioni di 2-20 nm che  
5 esplicano attività antimicrobica.

Le nano-strutture porose nano-tubolari dotate di elevata superficie attiva sono state ottenute su dispositivi implantari in titanio utilizzando la  
10 tecnica della dissoluzione anodica per via elettrochimica, un procedimento in grado di produrre strutture nanotubolari, costituite da biossido di titanio, di lunghezza variabile da 100 nanometri a 3 micron.

15 L'utilizzo di questa tecnica fa sì che le strutture nano-tubolari siano parte integrante del metallo consentendo così una elevata resistenza dovuta alla diretta interconnessione col metallo sottostante. Le anodizzazioni possono essere  
20 effettuate in diversi solventi di natura organica come ad esempio DMSO (Dimetilsolfossido) o NMF (N-Metil Formammide) oppure in solvente acquoso, utilizzando specifiche composizioni elettrolitiche a seguito specificate.

In base al solvente scelto e al tempo di anodizzazione si possono ottenere nanotubi caratterizzati da diverso diametro e lunghezza.

L'anodizzazione viene effettuata imponendo una  
5 differenza di potenziale tra l'impianto endoosseo (anodo) e un contro elettrodo (catodo) costituito da titanio o platino. In questa invenzione le procedure di anodizzazione sono state condotte impiegando una configurazione a due elettrodi e impiegando un  
10 alimentatore regolabile in tensione in corrente continua disponibile commercialmente a basso costo. I potenziali applicati nei processi di anodizzazione possono variare dai 20 ai 50 V in base al solvente utilizzato e in base allo spessore del substrato  
15 anodizzato desiderato.

La scelta del solvente risulta importante nel determinare i tempi di anodizzazione necessari ad ottenere la desiderata nanostruttura. In particolare, operando con solventi acquosi si può ottenere la  
20 formazione di nanotubi in tempi dell'ordine di 6-12 ore, mentre nei solventi organici utilizzati (DMSO o NMF) tali tempi risultano almeno raddoppiati (12-24 h). In generale, si potrà operare con tempi di anodizzazione variabili tra 6 e 48 ore, a seconda del  
25 solvente utilizzato e della lunghezza dei nanotubi

che si vuole ottenere. L'utilizzo di tempi di anodizzazione più lunghi comporta la formazione di nanotubi di lunghezze più elevate che possono raggiungere 3 micron e diametri nell'intervallo 50-  
5 100 nm.

Si deve notare che la presenza di acqua nei solventi organici utilizzati è fondamentale per la formazione del biossido di titanio costituente la struttura nanotubolare. Pertanto, quando il processo  
10 di anodizzazione è condotto in soluzione di un solvente organico, in particolare DMSO o NMF, tale soluzione conterrà acqua nell'intervallo dal 5% al 20% in volume.

L'applicazione di una differenza di potenziale  
15 fra l'impianto endosseo e il controelettrodo produce nella fase iniziale uno strato di ossido compatto che porta alla passivazione dell'impianto. Tale passivazione risulta in una diminuzione della corrente elettrica che passa attraverso la cella  
20 elettrolitica. E' fondamentale la presenza di fluoruri nella soluzione elettrolitica in modo da ottenere la dissoluzione dello strato di ossido precedentemente formato e la conseguente formazione di strutture nanotubolari.

Il processo di dissoluzione dello strato di ossido che porta alla formazione della struttura nano-tubolare è indicato dalla seguente equazione:



5 dove lo ione esafluoruro di titanio risulta solubile nel solvente che compone la soluzione elettrolitica. Come sorgente di fluoruri possono essere impiegati diversi sali a diversi livelli di concentrazione, quali ad esempio KF (0.1 M),  $\text{NH}_4\text{F}$  (0.5% p/p) o HF (2%  
10 v/v).

La velocità di anodizzazione è un parametro importante al fine di ottenere nanotubi delle dimensioni volute. Preferibilmente, si utilizzerà una densità di corrente elettrica compresa tra 10 e 100  
15  $\text{mA}/\text{cm}^2$ .

Dopo il processo di anodizzazione, il dispositivo implantare viene sottoposto a riscaldamento a temperature superiori a  $450^\circ\text{C}$ , tipicamente superiori a  $500^\circ\text{C}$ , ad esempio circa  
20  $550^\circ\text{C}$ , per un tempo sufficiente a convertire i nanotubi di biossido di titanio nella forma allotropica cristallina di anatase, compattarne la superficie ed eliminare eventuali impurezze organiche presenti sul dispositivo. Preferibilmente il

riscaldamento viene protratto per un tempo compreso tra 30 minuti e 2 ore, ad esempio circa 1 ora.

Dopo la trasformazione del diossido di titanio in anatase, il dispositivo implantare viene caricato  
5 con specie ioniche ad attività antimicrobica.

A tal fine, il dispositivo implantare dell'invenzione viene immerso in una sospensione di nanoparticelle di biossido di titanio di dimensione nell'intervallo 2-30 nm in una soluzione al 50% in  
10 volume di alcol etilico in acqua, contenente ioni argento con concentrazioni nell'intervallo  $10^{-4}$ - $10^{-1}$  M.

Tali soluzioni possono esse preparate utilizzando diversi sali o ioni complessi d'argento  
15 quali ad esempio argento nitrato, argento acetato, argento citrato, argento lattato, argento sulfadiazina, etc..

Le nanoparticelle di biossido di titanio sono in grado di adsorbire gli ioni  $\text{Ag}^+$  alla loro superficie  
20 ed hanno dimensioni tali da consentire la loro inserzione all'interno delle strutture nanotubolari con diametri nell'intervallo 30-50 nm. Il dispositivo implantare viene immerso in tali soluzioni e sottoposto a sonicazione per tempi dell'ordine di 5-  
25 15 minuti.

Un oggetto della presente invenzione è quindi un metodo per la preparazione di un dispositivo implantare che comprende i seguenti passaggi:

a) sottoporre detto dispositivo implantare in  
5 titanio o sue leghe ad un processo di anodizzazione come sopra descritto, in acqua o in un solvente organico contenente una quantità di acqua inferiore a 25% in volume, detto solvente organico essendo preferibilmente DMSO o NMF, in modo da formare su  
10 detto dispositivo implantare uno strato di nanotubi di titanio diossido;

b) trattare detto dispositivo implantare ad una temperatura superiore a 450°C o superiore a 500°C per un tempo sufficiente a trasformare detto diossido di  
15 titanio nella sua forma allotropica cristallina di anatase;

c) caricare detti nanotubi di diossido di titanio in forma allotropica cristallina di anatase con ioni di una specie ad attività antimicrobica,  
20 preferibilmente ioni  $\text{Ag}^+$ , in cui detti ioni sono preventivamente adsorbiti su nanoparticelle di diossido di titanio di dimensioni tali da inserirsi in detti nanotubi.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è  
25 costituito da un dispositivo implantare in titanio o

sue leghe comprendente uno strato esterno di nanotubi di diossido di titanio nella forma allotropica cristallina di anatase, caratterizzato dal fatto che detti nanotubi di diossido di titanio sono caricati  
5 con nanoparticelle di diossido di titanio su cui è assorbita una specie ionica ad attività antimicrobica.

Preferibilmente detta specie ionica è costituita da ioni  $\text{Ag}^+$ .

10 Ancora un ulteriore oggetto dell'invenzione è costituito da un impianto dentale, tipicamente una vite, in titanio o sue leghe, caratterizzato dal fatto di comprendere sulla sua superficie uno strato di nanotubi di diossido di titanio nella forma  
15 allotropica cristallina di anatase.

Preferibilmente, detti nanotubi sono caricati con una specie ionica ad attività antimicrobica, quale ioni  $\text{Ag}^+$ . In una forma di realizzazione particolarmente preferita, detti nanotubi sono  
20 caricati con nanoparticelle di diossido di titanio su cui è assorbita detta specie ionica ad attività antimicrobica.

#### **METODI PREPARATIVI**

Le metodologie preparative a seguito descritte  
25 si applicano sia ad impianti dentali in forma di viti

sia più in generale ad impianti endossei di diversa forma e dimensione. Le metodiche sono state messe a punto utilizzando lamine di titanio o di leghe di titanio dello spessore di alcune centinaia di micron  
5 e di area di 2,5x5cm, pretrattate mediante un processo di sabbiatura per ottenere superfici macro-porose analoghe a quelle utilizzate per gli impianti endossei. La scelta di operare con lamine di titanio è legata alla necessità di condurre le analisi  
10 biologiche a seguito descritte che richiedono una particolare geometria per i campioni investigati.

Prima di operare la dissoluzione anodica, che porta alla formazione delle strutture nano-tubolari, le lamine in Titanio sono state preventivamente  
15 pulite con lavaggi in acqua e acetone e sonicate con ultrasuoni in una soluzione acquosa di detergente (Alconox) per un tempo di circa 10 minuti.

Le anodizzazioni sono state effettuate ponendo frontalmente due lamine di Titanio in una soluzione  
20 elettrolitica ad una distanza di circa 6 mm (Fig.1). la soluzione elettrolitica veniva mantenuta sotto agitazione tramite agitatore magnetico. L'area dell'elettrodo immersa nella soluzione elettrolitica era di circa 2,5 x 2,5 cm. La restante superficie non  
25 immersa veniva utilizzata per il contatto elettrico e

per evitare che la risalita di soluzione elettrolitica per capillarità portasse a cortocircuiti della cella.

Le anodizzazioni sono state effettuate in tre  
5 solventi:  $\text{H}_2\text{O}$ , DMSO ed NMF ottenendo per i solventi organici DMSO ed NMF analoghi risultati.

Nel caso del solvente acquoso, le anodizzazioni sono state eseguite applicando, alle due lamine di Titanio, una differenza di potenziale di 24V per un  
10 tempo tra le 6 e le 12h (Fig. 2) in una soluzione contenente come donatore di fluoruri KF (0.1 M) e come elettrolita di supporto  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.5 M). L'andamento non lineare della corrente registrato durante le anodizzazioni, come mostrato in Fig. 2, è  
15 dovuto alla competizione fra i processi di formazione e dissoluzione dell'ossido. Se la velocità di formazione dell'ossido è più elevata della sua dissoluzione si ottiene la passivazione dell'elettrodo con una conseguente diminuzione della  
20 corrente registrata. Viceversa, quando la dissoluzione è più veloce del processo di ossidazione del Titanio si ha una più ampia superficie del metallo esposta alla soluzione, che comporta un aumento della corrente registrata. La formazione di  
25 strutture ordinate di nanotubi è dovuta alla

dissoluzione dell'ossido attraverso "corsie preferenziali" dettate dal rafforzamento del campo elettrico nelle zone in cui l'iniziale dissoluzione ha reso lo strato di ossido più sottile, velocizzando  
5 così la crescita e la relativa dissoluzione dell'ossido in quella particolare zona. La velocità con cui avviene la dissoluzione è fondamentale, dissoluzioni troppo veloci o troppo lente non portano alla formazione dell'ossido.

10 Per quanto riguarda la dissoluzione anodica effettuata in DMSO o NMF, contenente HF 2% in volume o  $\text{NH}_4\text{F}$  allo 0.5% in peso, è stata applicata una differenza di potenziale di 40V per un tempo fra 12 e 24h. Le anodizzazioni sono state effettuate a  
15 temperatura ambiente (circa 20°C).

La presenza dei fluoruri è fondamentale per scavare le superfici di ossido formatosi a seguito del processo di anodizzazione della lamina di Titanio. In Figura 2 è possibile osservare che  
20 durante l'anodizzazione si verifica un aumento della corrente dovuto ad una più veloce dissoluzione dello strato di ossido rispetto alla sua formazione, mentre la diminuzione della corrente è dovuta ad una passivazione dell'elettrodo causata dalla formazione  
25 di uno strato di ossido spesso. La scelta del tempo

di anodizzazione è determinante ai fini di ottenere una particolare morfologia alla superficie di un impianto endoosseo. Tempi di anodizzazione elevati portano in generale alla formazione di strutture di  
5 nano-tubi che possono raggiungere lunghezze dell'ordine di 3 micron, mentre tempi di anodizzazione troppo brevi non portano alla formazione di strutture nano-tubolari.

Una volta concluso il processo di anodizzazione,  
10 le lamine sono state trattate con acqua e acetone e sonicate con ultrasuoni per circa 10 minuti in acqua distillata per eliminare eventuali residui di biossido di titanio non legati stabilmente alla loro superficie. Infine le lamine in Titanio anodizzate  
15 sono state sottoposte a riscaldamento a 550°C per 1h, allo scopo di convertire i nanotubi di biossido di titanio nella forma allotropica di anatase, compattarne la superficie ed eliminare eventuali impurezze organiche presenti sulle lamine.

20 La corrente prodotta durante l'anodizzazione è stata registrata, ad intervalli di tempo di un minuto, da un multimetro digitale Velleman DVM 1200 interfacciato ad un PC oppure ogni trenta secondi con un multimetro digitale Tenma 72-7730 anch'esso  
25 interfacciato al PC. Le anodizzazioni sono state

effettuate grazie ad una alimentatore Thurlby Thandar Instruments EX752M.

I campioni in titanio anodizzato secondo le procedure precedentemente descritte sono stati  
5 immersi in una sospensione di nanoparticelle di biossido di titanio di dimensione nell'intervallo 2-30 nm in una soluzione al 50% in volume di alcol etilico in acqua contenenti ioni argento con concentrazioni nell'intervallo  $10^{-4}$ - $10^{-1}$  M.

10 Tali soluzioni possono esse preparate utilizzando diversi sali o ioni complessi d'argento quali ad esempio argento nitrato, argento acetato, argento citrato, argento lattato, argento sulfadiazina, etc.

Le nanoparticelle di biossido di titanio sono in  
15 grado di adsorbire gli ioni  $\text{Ag}^+$  alla loro superficie e le loro dimensioni ne consentono l'inserzione all'interno delle strutture nanotubolari con diametri nell'intervallo 30-50 nm. I campioni in titanio anodizzato sono stati immersi nelle sospensioni  
20 contenenti ioni argento e sottoposti a sonicazione per tempi dell'ordine di 5-15 minuti. I campioni sono stati poi lavati con etanolo ed essiccati a 60 °C.

#### **CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA**

Le lamine di titanio trattate sono state  
25 caratterizzate mediante microscopia elettronica SEM

mostrando come, sia per le dissoluzioni anodiche effettuate in acqua (Fig.3) che per quelle effettuate in DMSO o NMF (Fig. 4), si abbia la formazione di strutture nano-tubolari, presenti in modo omogeneo su tutto l'elettrodo, sia sulla faccia posta frontalmente al controelettrodo che sulla faccia opposta. Dalle immagini SEM è possibile notare come i nanotubi prodotti per anodizzazione in acqua siano lunghi circa 300-400 nm mentre quelli realizzati in DMSO o NMF raggiungano lunghezze di un micron.

#### **ATTIVITA' ANTIMICROBICA**

E' stata verificata l'attività antimicrobica delle lamine in titanio, preparate secondo le procedure precedentemente descritte che prevedono il processo di anodizzazione e la successiva inserzione di ioni argento, effettuando test con i seguenti ceppi batterici: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.

#### PROCEDURA SPERIMENTALE

##### 20 Microrganismi

Sono stati utilizzati i seguenti ceppi test:

|                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> | ATCC 15442 |
| <u><i>Staphylococcus aureus</i></u>  | ATCC 6538  |
| <u><i>Escherichia coli</i></u>       | ATCC 10536 |
| 25 <u><i>Candida albicans</i></u>    | ATCC 10231 |

I ceppi provengono dal Dipartimento di Medicina  
Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Microbiologia,  
dell'Università di Ferrara e sono stati acquistati  
dalle ditte Diagnostic International Distribution SpA  
5 e VWR International Srl.

#### Mantenimento

I ceppi batterici sono stati mantenuti congelati  
in brodo di coltura e glicerolo al 50% (v/v); prima  
dell'utilizzo sono stati trapiantati su slant di TSA  
10 e conservati in frigorifero a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

*Candida albicans* è stata mantenuta congelata in  
brodo di coltura e glicerolo al 50% (v/v); prima  
dell'utilizzo è stata trapiantata su slant di Malt  
Extract Agar e conservata in frigorifero a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### 15 TERRENI COLTURALI E REAGENTI

##### Terreni

Tryptone Soya Agar (TSA) per i ceppi batterici e  
Malt Extract Agar (MEA) per *Candida albicans*.

##### Diluente

#### 20 Triptone, digestione

|                        |       |       |
|------------------------|-------|-------|
| pancreatica di caseina | 1.0 g | OXOID |
|------------------------|-------|-------|

|      |       |       |
|------|-------|-------|
| NaCl | 8.5 g | MERCK |
|------|-------|-------|

Acqua distillata q.b. 1000 ml

#### APPARECCHIATURE

|    |                                        |    |
|----|----------------------------------------|----|
| 25 | - Stufa per la sterilizzazione a secco | KW |
|----|----------------------------------------|----|

- Autoclave a vapore COLUSSI
- Termostato MEMMERT
- Agitatore Vortex VELP
- Cronometro ARBORE
- 5 - Micropipette GILSON

#### Preparazione delle sospensioni di prova

I ceppi batterici e il ceppo di *Candida albicans*, una volta scongelati, sono stati trapiantati per 2 volte di seguito su slant di TSA  
 10 (MAE per *Candida albicans*) e incubati a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 18 ore, ottenendo la coltura di lavoro. Entro 2 ore dall'inizio del test la coltura di lavoro è stata sospesa in diluente usando palline di vetro e la sospensione è stata diluita fino ad ottenere una  
 15 conta da  $1.5 \times 10^7$  a  $5.0 \times 10^7$  ufc/ml (sospensione di prova).

#### Conteggio delle sospensioni di prova

Sono state effettuate diluizioni seriali in diluente fino a  $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  delle sospensioni di prova  
 20 aventi concentrazione da  $1.5 \times 10^7$  a  $5.0 \times 10^7$  ufc/ml. E' stato effettuato un conteggio in doppio per inclusione in Agar. E' stato determinato il numero di ufc/ml della sospensione dopo un periodo di incubazione di 24 ore a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

25 Esecuzione del saggio

Per ogni ceppo dei microrganismi è stata allestita una provetta contenente 5 ml di sospensione di prova avente una concentrazione tra  $1.5 \times 10^7$  e  $5.0 \times 10^7$  ufc/ml.

5 Le lamine in titanio trattate secondo le procedure di anodizzazione ed inserzione di ioni argento e non trattate (Controllo) sono state immerse nelle sospensioni di prova contenenti le diverse specie microbiche ed estratti dopo 10 secondi. I  
10 campioni sono stati lasciati sotto cappa sterile a contatto con l'aria per un tempo pari a 5 minuti. Al termine di questo tempo, le lamine di titanio sono state poste in piastre Petri e ricoperte con terreno di coltura liquido, mantenuto alla temperatura di  
15  $45^{\circ}\text{C}$ . Le piastre Petri sono state poste in agitazione per 1 minuto, al fine di favorire la diffusione omogenea in tutta la piastra dei microrganismi adesi alla superficie delle lamine in titanio e il terreno è stato poi lasciato solidificare. Le piastre Petri  
20 sono state infine poste in cella di incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$  per 24 ore.

Trascorso questo tempo le piastre sono state esaminate valutando lo sviluppo delle colonie batteriche e fungine.

## 25 **RISULTATI**

L'analisi delle piastre relative ai campioni di controllo ha evidenziato la crescita di un elevatissimo numero di colonie microbiche mentre le piastre relative alle lamine trattate con le  
5 procedure descritte in questo brevetto hanno dimostrato attività antimicrobica, inducendo la totale mortalità delle cellule microbiche venute a contatto con la sua superficie. A fronte di un numero non contabile di colonie (superiore alla decina di  
10 migliaia) formatesi nelle piastre Petri relative ai controlli, nelle piastre Petri includenti le lamine trattate non vi è stata crescita di colonie.

#### **CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA RELATIVA AI PROCESSI DI OSTEOINDUZIONE**

15        Principio dell'indagine

Lo scopo di questa indagine è di verificare gli effetti biologici di una lega di titanio la cui superficie è stata rivestita con nanotubi.

A tale scopo sono state allestite delle colture  
20 di cellule staminali derivate da polpa dentaria selezionate come clone CD105 positive, CD90 positive, CD73 positive e CD 34 negative, che poste in coltura con appropriato terreno si differenziano in osteoblasti [Pittenger MF et al. Multilineage  
25 potential of adult human mesenchymal stem cells.

Science 1999;284:143-147.]. Tali cellule sono state coltivate su dischetti di titanio rivestiti di nanotubi e su dischetti di titanio macchinato (cioè non rivestito da nanotubi) ed utilizzato come controllo. Dopo 15 e 30 giorni le cellule sono state staccate, è stato estratto il RNA messaggero ed è stata misurata, mediante PCR Real Time, l'espressione di specifici geni la cui funzione è correlata all'osteo-differenziamento. Tutto questo per verificare le potenzialità osteodifferenziative della superficie di nanotubi. Infatti, quando le protesi metalliche vengono inserite nelle ossa dei pazienti non stimolano solo una attività osteoblastica, ma anche una attività delle cellule staminali che è rilevante al fine del processo osteointegrativo.

#### Materiali e Metodi

##### *Isolamento di cellule staminali da polpa dentaria*

La polpa dentaria da cui ricavare le cellule staminali è stata estratta da denti terzi molari di individui sani di età compresa tra i 20 -25 anni in seguito a consenso informato.

La polpa è stata poi immersa in una soluzione di digestione (3 mg/ml di collagenasi tipo I e 4 mg/ml di dispasi disciolti in 4 ml di una soluzione salina

0,1 M di tampone fosfato (PBS) integrata con 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomicina, e 500 mg/ml di claritromicina) e incubata per 1 ora a 37 ° C. Una volta digerita, la soluzione è stata filtrata  
5 con filtri cellulari Falcon da 70 micron (Sigma Aldrich).

Dopo la filtrazione, le cellule sono state poste in fiasche T75, contenenti terreno di coltura  $\alpha$ -MEM integrato con il 20% di FBS, 100  $\mu$ M di acido-  
10 ascorbico, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml di penicillina, 100 mg/ml di streptomicina e incubate a 37 ° C e 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno è stato cambiato due volta a settimana. Poco prima che le cellule diventassero confluenti, sono state suddivise in  
15 nuove fiasche.

Per il saggio, le cellule staminali al secondo passaggio sono state staccate mediante tripsina e seminate su piastre la cui superficie è stata ricoperta da nanotubi di titanio.

20 Un'altra serie di pozzetti contenenti le cellule seminate su piastre di titanio macchinato sono stati utilizzati come controllo.

Le cellule sono state raccolte a 15 e 30 giorni di trattamento per l'estrazione dell'RNA.

25 Estrazione dell'RNA

La trascrizione inversa a cDNA è stata effettuata direttamente dal lisato delle cellule poste in coltura mediante il Kit "TaqMan Gene Expression Celle-to-Ct" (Ambion Inc., Austin, TX, USA), seguendo le istruzioni del produttore. In breve, le cellule sono state lisate con un buffer di lisi e l'RNA liberato in questa soluzione è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando una specifica retrotrascrittasi e relativo buffer.

Il cDNA così ottenuto è stato amplificato mediante Real Time PCR utilizzando una miscela di amplificazione, la TaqMan Gene Expression Master Mix in dotazione con il kit e saggi di amplificazione (primers e sonde) specifici per i geni da indagare.

#### PCR Real Time

L'espressione dei geni indagati è stata quantificata mediante PCR Real Time.

I livelli di espressione genica sono stati normalizzati mediante un gene di riferimento housekeeping RPL13A. Successivamente l'espressione delle cellule trattate con i nanotubi è stata comparata con quella delle cellule non trattate, attraverso il metodo statistico del  $\Delta\Delta Ct$  [Livak e Schmittgen, 2001].

I primers forward e reverse e le sonde per i geni selezionati sono stati progettati utilizzando il programma Primer Software Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Per questo  
5 esperimento sono state utilizzate sonde Taq Man (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) di geni la cui espressione è legata all'osteoiduzione e osteodifferenziamento.

Tutte le reazioni di PCR sono state eseguite in  
10 un volume di 20 microlitri utilizzando lo strumento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguendo un protocollo di PCR che prevede una denaturazione iniziale del DNA a 95°C seguita da due step, una denaturazione a 95°C per 15 sec e un  
15 annealing dei primer e sonde a 60°C per 1 minuto, per 40 cicli.

## RISULTATI

Al fine di testare l'effetto osteoinducente dei nanotubi di titanio, sono stati misurati i livelli di  
20 espressione di quei geni la cui funzione è correlata alla mineralizzazione e alla deposizione della matrice ossea, in cellule staminali sottoposte a trattamento per 15 e 30 giorni, il lasso di tempo più rilevante al fine del processo osteo-integrativo.

Mediante PCR Real Time sono stati analizzati due fattori di trascrizione fondamentali nel differenziamento osteoblastico (RUNX2 e FOSL1), alcuni geni legati al differenziamento dell'osso SPP1 (Osteopontina), BGLAP (osteocalcina) e ALPL (fosfatasi alcalina), i geni del collagene (COL1A1 e COL3A1) e un gene caratteristico delle cellule staminali la cui espressione varia durante il differenziamento cellulare (ENG).

10 Dopo 15 giorni di trattamento nelle cellule staminali coltivate sui nanotubi di titanio rispetto al controllo si osserva una marcata sovra-espressione dei geni RUNX2, FOSL1, ALPL, BGLAP, COL1A1 e una moderata sovra-regolazione dei geni ENG e COL3A1. Al  
15 contrario i geni SP7 e SPP1 risultano sotto-espressi (Fig. 5)

I risultati della PCR real-time hanno dimostrato che dopo 30 giorni di trattamento, rispetto alle cellule di controllo, gli osteogeni SP7, FOSL1, COL1A1 e BGLAP sono sovra-espressi mentre RUNX2, ENG, ALPL e COL3A1 sono sotto-regolati (Fig. 6). L'espressione di SPP1 sostanzialmente non cambia.

Analizzando più nel dettaglio i risultati possiamo osservare che il fattore di trascrizione  
25 RUNX2 risulta sovra-espresso nelle cellule trattate

rispetto alle cellule di controllo dopo 15 giorni e sotto-espresso dopo 30 giorni. RUNX2 è un importante modulatore della differenziazione degli osteoblasti che viene attivato nelle prime fasi di differenziazione e svolge un ruolo fondamentale nella maturazione degli osteoblasti e nell'omeostasi. Si evince che i nanotubi di titanio quindi promuovono l'osteodifferenziazione delle cellule staminali nelle prime fasi di trattamento.

10 Un effetto inverso è stato osservato per un altro fattore trascrizionale, SP7, che regola la formazione delle ossa e la differenziazione degli osteoblasti e che è a valle di RUNX2.

Nelle cellule staminali trattate SP7 è sotto-  
 15 espresso nei primi giorni di trattamento ma tende poi ad aumentare nei successivi 30 giorni.

I nanotubi di titanio sono in grado di modulare anche l'espressione dei geni che codificano per le proteine collagene della matrice extracellulare come  
 20 il collagene di tipo 1 $\alpha$ 1 (COL1A1) e collagene di tipo 3 $\alpha$ 1 (COL3A1).

Dopo 15 giorni di trattamento è stata osservata una marcata sovra-espressione di COL1A1 e una più modesta sovra-regolazione di COL3A1.

A 30 giorni di trattamento l'espressione di COL3A1 cala, perché i nanotubi di titanio inducono la sintesi della matrice nei primi stadi di differenziazione e proliferazione degli osteoblasti.

5        È stato dimostrato che la sintesi di collagene di tipo I è associata alla differenziazione degli osteoblasti nella fase iniziale, seguita dalla sintesi di ALP e osteocalcina (BGLAP).

10       In tale studio ALPL è significativamente sovra-espresso dopo 15 giorni di trattamento. L'aumento d'espressione di ALPL è stato largamente associato alla differenziazione degli osteoblasti.

15       Anche l'osteocalcina (BGLAP), una proteina coinvolta nella mineralizzazione e il riassorbimento osseo, viene sovra-espressa a 15 e 30 giorni di trattamento.

L'osteocalcina è attivata immediatamente prima della mineralizzazione e la sua espressione continua ad aumentare nelle fasi successive.

20       I nanotubi di titanio determinano poi la significativa sovra-espressione del gene FOSL1. Tale gene codifica per un componente del fattore di trascrizione AP-1 i cui siti sono presenti nei promotori di osteogeni, tra cui la fosfatasi  
25       alcalina, collagene I, osteocalcina.

Infine l'espressione di endoglin (ENG), un marker di superficie utilizzato per caratterizzare le cellule staminali mesenchimali, rimane inalterata nei primi 15 giorni di trattamento con i nanotubi di titanio. Successivamente la sua espressione cala sensibilmente nelle cellule staminali trattate, indicando l'effetto osteoinducente di questo biomateriale sulle cellule staminali. E' stato dimostrato infatti che la scomparsa dell'antigene ENG durante l'osteogenesi suggerisce che questa proteina è coinvolta nella regolazione dell'osteogenesi.

### **CONCLUSIONI**

Il trattamento delle dispositivi implantari in titanio o sue leghe attraverso processi di anodizzazione e successiva inserzione di ioni argento ha dimostrato che le nanostrutture nanotubolari in titanio esplicano attività antimicrobica e influenzano fortemente il comportamento delle cellule staminali in vitro, aumentandone la proliferazione, la differenziazione in osteoblasti e la deposizione della matrice ossea.

## RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la preparazione di un dispositivo implantare in titanio o sue leghe che comprende i seguenti passaggi:

5        a) sottoporre detto dispositivo implantare in titanio o sue leghe ad un processo di anodizzazione, in acqua o in un solvente organico contenente una quantità di acqua inferiore a 25% in volume, in modo da formare su detto dispositivo implantare uno strato  
10 di nanotubi di titanio diossido;

      b) trattare detto dispositivo implantare ad una temperatura superiore a 450°C o superiore a 500°C per un tempo sufficiente a trasformare detto titanio diossido nella sua forma allotropica cristallina di  
15 anatase;

      c) caricare detti nanotubi di titanio diossido in forma allotropica cristallina di anatase con ioni di una specie ad attività antimicrobica.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui  
20 detti ioni di una specie ad attività antimicrobica sono ioni  $\text{Ag}^+$ .

3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui detti ioni di una specie ad attività antimicrobica sono preventivamente adsorbiti su

nanoparticelle di diossido di titanio di dimensioni tali da inserirsi in detti nanotubi.

4. Metodo secondo la rivendicazione 3, in cui dette particelle di diossido di titanio hanno  
5 dimensioni comprese tra 2 e 20 nm.

5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detto solvente organico è scelto tra dimetilsolfossido e N-metilformamide.

10 6. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui detto passaggio a) di anodizzazione viene condotto impiegando una configurazione a due elettrodi e un alimentatore regolabile in tensione in corrente, operando con  
15 differenze di potenziale dai 20 ai 50 V.

7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui i tempi di anodizzazione sono variabili tra 6 e 48 ore.

8. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui i  
20 tempi di anodizzazione in solvente acquoso sono compresi nell'intervallo 6-12 ore, mentre in solventi organici sono compresi nell'intervallo 12-24 ore.

9. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui, quando  
25 l'anodizzazione viene condotta in solvente organico,

detto solvente organico contiene una quantità d'acqua compresa tra 5 e 20% in volume.

10. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui detto passaggio a) di  
5 anodizzazione è condotto in presenza di sali fluoruro.

11. Metodo secondo la rivendicazione 10, in cui detti Sali fluoruro sono scelti tra KF 0.1 M,  $\text{NH}_4\text{F}$  0.5% p/p e HF 2% v/v.

10 12. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 11, in cui detto passaggio a) di anodizzazione viene condotto con una densità di corrente elettrica compresa tra 10 e 100  $\text{mA}/\text{cm}^2$ .

13. Metodo secondo una qualsiasi delle  
15 rivendicazioni da 1 a 12, in cui detto passaggio b) viene condotto per un tempo compreso tra 30 minuti e 2 ore.

14. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 13, in cui detto passaggio b)  
20 viene condotto ad una temperatura di circa 550°C e per un tempo di circa 1 ora.

15. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui detto passaggio c) viene condotto immergendo detto dispositivo  
25 impiantare in una sospensione di nanoparticelle di

biossido di titanio di dimensione nell'intervallo 2-30 nm in una soluzione al 50% in volume di alcol etilico in acqua, contenente ioni argento con concentrazioni nell'intervallo  $10^{-4}$ - $10^{-1}$  M, in cui gli  
5 ioni argento sono preferibilmente derivati da un sale scelto tra argento nitrato, argento acetato, argento citrato, argento lattato, argento sulfadiazina, e sottoponendo il dispositivo impiantare in detta soluzione a sonicazione per tempi dell'ordine di 5-15  
10 minuti.

16. Dispositivo impiantare in titanio o sue leghe comprendente uno strato esterno di nanotubi di diossido di titanio nella forma allotropica cristallina di anatase, caratterizzato dal fatto che  
15 detti nanotubi di diossido di titanio sono caricati con nanoparticelle di diossido di titanio su cui è assorbita una specie ionica ad attività antimicrobica.

17. Dispositivo impiantare secondo la  
20 rivendicazione 16, in cui detta specie ionica ad attività antimicrobica è costituita da ioni  $\text{Ag}^+$ .

18. Dispositivo impiantare secondo la rivendicazione 16 o 17, in cui detta specie ionica è adsorbita su particelle di titanio diossido di

dimensioni tali da inserirsi all'interno di detti nanotubi.

19. Dispositivo implantare secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 16 a 18, in cui detti  
5 nanotubi hanno una lunghezza compresa tra 100 nm e 3 micron e diametri compresi tra 30 e 50 nm ed in cui dette particelle di titanio diossido inseribili in detti nano tubi hanno dimensioni comprese tra 2 e 30 nm.

10 20. Dispositivo implantare secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 16 a 19, in cui detto dispositivo è una vite per impianto dentale.

## CLAIMS

1. Method for preparing an implant device made of titanium or alloys thereof, comprising the following steps:

a) subjecting said implant device made of titanium or alloys thereof to an anodizing process, in water or in an organic solvent containing an amount of water lower than 25% by volume, so as to form a layer of nanotubes made of titanium dioxide on said implant device;

b) processing said implant device at a temperature higher than 450°C or higher than 500°C for a period of time sufficient to transform said titanium dioxide into its anatase allotropic crystalline form;

c) loading said nanotubes made of titanium dioxide in anatase allotropic crystalline form with ions of a substance having antimicrobial activity.

2. Method according to claim 1, wherein said ions of a substance having antimicrobial activity are Ag<sup>+</sup> ions.

3. Method according to claim 1 or 2, wherein said ions of a substance having antimicrobial activity are previously adsorbed on nanoparticles of titanium dioxide having a dimension allowing them to be inserted in said nanotubes.

4. Method according to claim 3, wherein said titanium dioxide particles have a dimension ranging from 2 to 20 nm.

5. Method according to any one of claims 1 to 4, wherein said organic solvent is selected between dimethylsulfoxide and N-methylformamide.

6. Method according to any one of claims 1 to 5, wherein said anodizing step a) is carried out by employing an arrangement made of two-electrodes and an adjustable current voltage power supply, operating at potential difference ranging from 20 to 50 V.

7. Method according to any one of claims 1 to 6, wherein anodizing times range from 6 to 48 hours.

8. Method according to claim 7, wherein the times for anodization in aqueous solvent are in the range of 6-12 hours, whereas the times for anodization in organic solvents are in the range of 12-24 hours.

9. Method according to any one of claims 1 to 8, wherein, when the anodization is carried out in an organic solvent, said organic solvent contains an amount of water ranging from 5% to 20% by volume.

10. Method according to any one of claims 1 to 9, wherein said anodizing step a) is carried out in the presence of fluoride salts.

11. Method according to claim 10, wherein said fluoride salts are selected from among KF 0.1 M,  $\text{NH}_4\text{F}$  0.5% w/w and HF 2% v/v.

12. Method according to any one of claims 1 to 11, wherein said anodizing step a) is carried out with a current density ranging from 10 to 100  $\text{mA}/\text{cm}^2$ .

13. Method according to any one of claims 1 to 12, wherein said step b) is carried out for a time period ranging from 30 minutes to 2 hours.

14. Method according to any one of claims 1 to 13, wherein said step b) is carried out at a temperature of about 550°C and for a time period of about an hour.

15. Method according to any one of claims 1 to 14, wherein said step c) is carried out by submerging said implant device in a suspension of nanoparticles of titanium dioxide having a size in the range of 2-30 nm in a 50% by volume aqueous solution of ethyl alcohol, containing silver ions with a concentration ranging from  $10^{-4}$  to  $10^{-1}$  M, in which the silver ions are preferably derived from a salt selected among silver nitrate, silver acetate, silver citrate, silver lactate, silver sulfadiazine, and subjecting the implant device in said solution to sonication for times ranging from 5 to 15 minutes.

16. Implant device made of titanium or alloys thereof comprising an outer layer of nanotubes made of titanium dioxide in the anatase allotropic crystalline form, characterised in that said nanotubes made of titanium dioxide are filled with nanoparticles of titanium dioxide on which a ionic substance having antimicrobial activity is absorbed.

17. Implant device according to claim 16, wherein said ionic substance having antimicrobial activity consists of  $\text{Ag}^+$  ions.

18. Implant device according to claim 16 or 17, wherein said ionic substance is adsorbed on titanium dioxide particles having a size allowing them to be inserted in said nanotubes.

19. Implant device according to any one of claims 16 to 18, wherein said nanotubes have a length ranging from 100 nm to 3 microns and diameters ranging from 30 to 50 nm and wherein said titanium dioxide particles which can be inserted in said nanotubes have a size ranging from 2 to 30 nm.

20. Implant device according to any one of claims 16 to 19, wherein said device is a dental implant screw.

TAV.: I

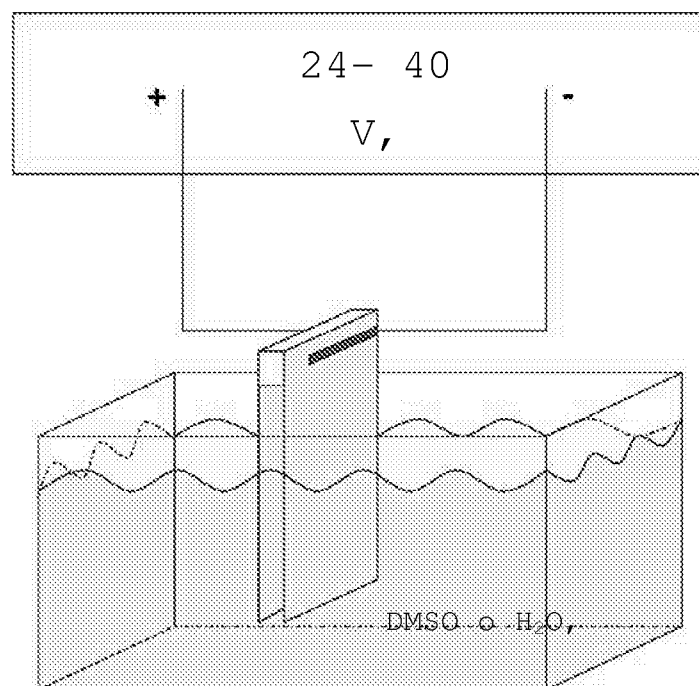


Fig. 1

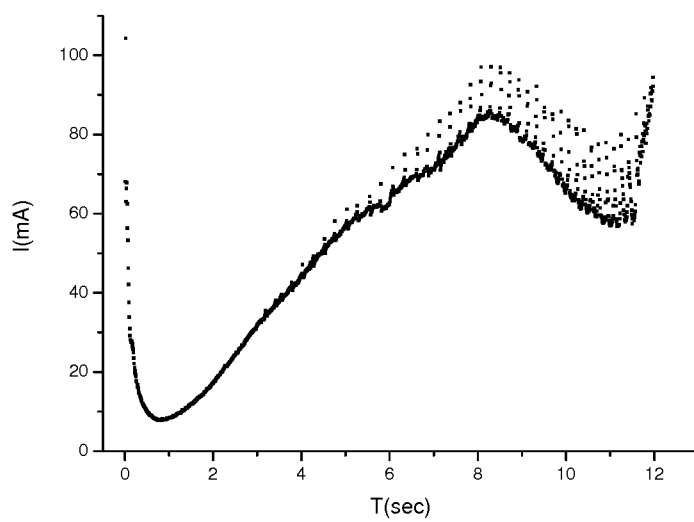


Fig. 2

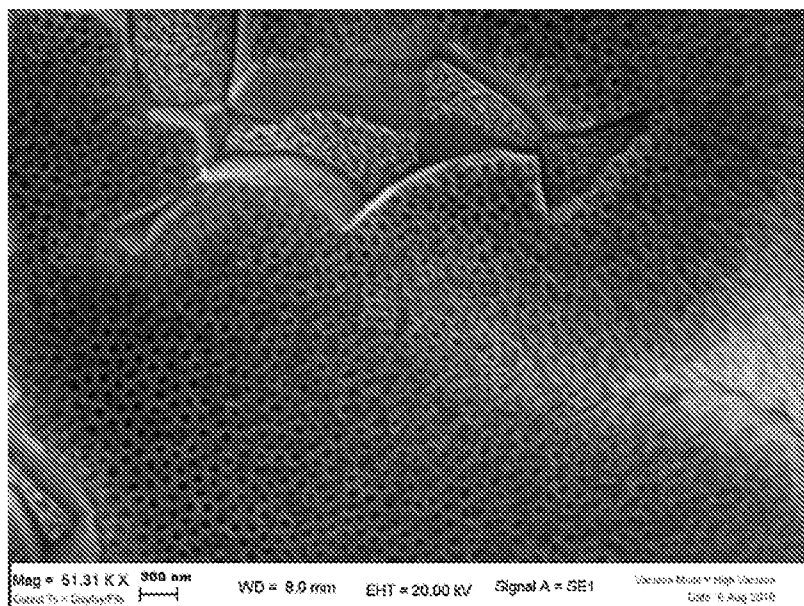


Fig. 3

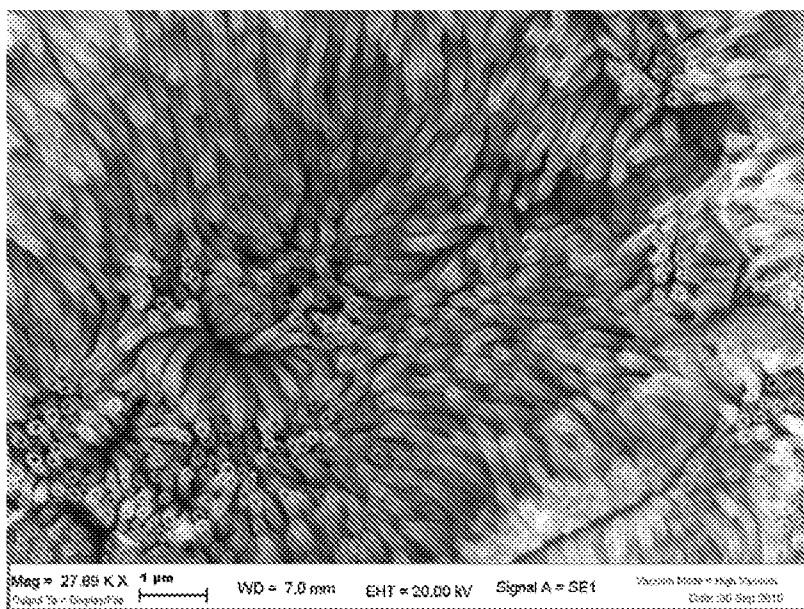


Fig. 4

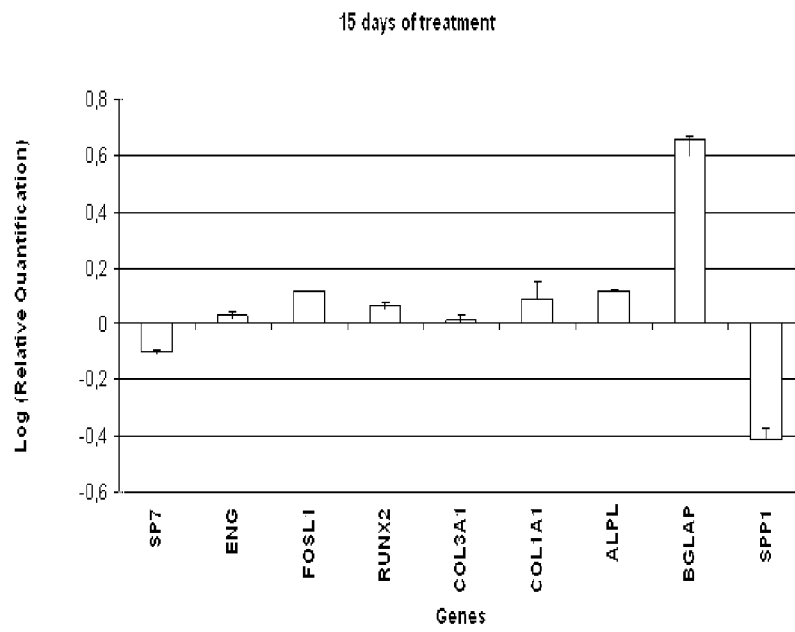


Fig. 5

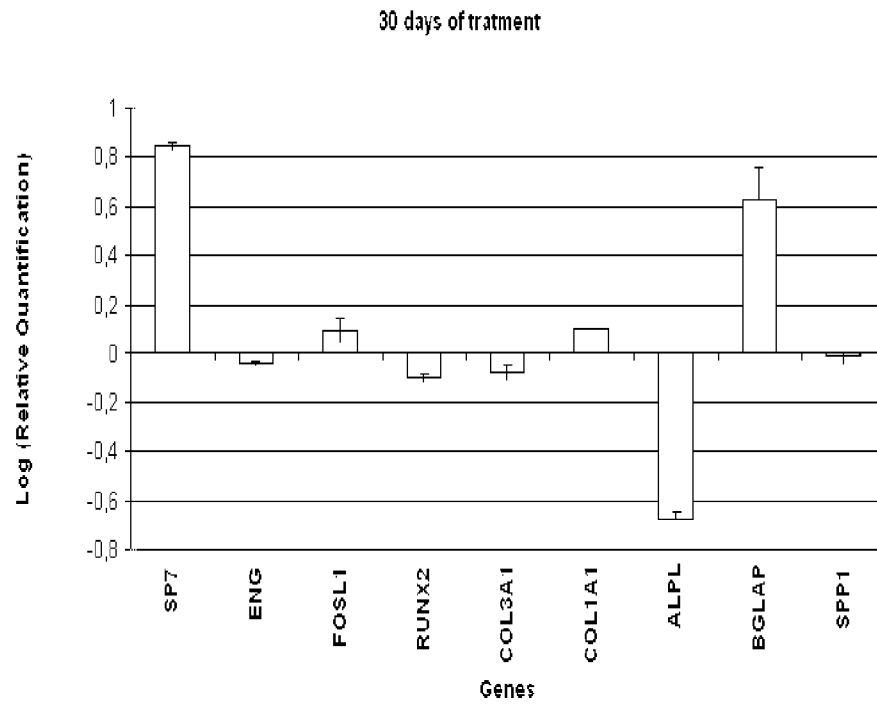


Fig. 6