



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 429**

51 Int. Cl.:
A61L 27/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04015348 .8**

96 Fecha de presentación : **30.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1618904**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.01.2006**

54 Título: **Implante con una superficie biofuncionalizada y procedimiento para su producción.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2010

73 Titular/es: **FRIADENT GmbH**
Steinzeugstrasse 50
68229 Mannheim, DE

72 Inventor/es: **Becker, Klaus;**
Scharnweber, Dieter;
Bierbaum, Susanne y
Worch, Hartmut

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 347 429 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Implante con una superficie biofuncionalizada y procedimiento para su producción.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un implante con una superficie mejorada y a procedimientos para su producción. El implante de acuerdo con la invención puede usarse en el campo de la medicina, en particular para contacto con tejido blando y hueso o como prótesis dental.

10 **Antecedentes de la invención**

Los fosfatos cálcicos y especialmente las apatitas son componentes naturales del hueso y de los dientes. Se sabe que el revestimiento de implantes protésicos con fosfatos cálcicos mejora la eficacia y la biocompatibilidad de los dispositivos, por estimulación del crecimiento hacia el interior del hueso o por formación de uniones con la estructura del hueso.

El fosfato cálcico (CP) se conoce en diferentes fases, con propiedades y composiciones físicas y químicas distintas. Las apatitas como hidroxiapatita (HAP) y fluoroapatita (FAP) son extremadamente poco solubles en agua. El fosfato cálcico amorfo (ACP), la brushita y la monetita tienen al contrario solubilidades en agua que son varias magnitudes superiores.

Se conocen del estado la técnica varias estrategias para revestir superficies de materiales de implante con fosfato cálcico o hidroxiapatita:

El documento WO 02/05862 A1 se refiere a capas compuestas de fosfato cálcico que se depositan electroquímicamente sobre implantes óseos. Dichas capas compuestas altamente porosas en implantes están hechas de al menos dos fases de fosfato cálcico de diferente solubilidad. Las capas compuestas contienen aparte del fosfato cálcico difícilmente soluble del hueso maduro, en particular, las fases más fácilmente solubles del tejido óseo joven.

Los documentos US 5.205.921 y CA 2.073.781 A describen un procedimiento para la producción de un revestimiento de fosfato cerámico adherente sobre implantes protésicos por electrodeposición de óxido de aluminio o fosfato cálcico en forma de la brushita relativamente soluble en agua. La temperatura del procedimiento es de aproximadamente 65°C.

El documento EP1264606 A1 se refiere a la producción de un material metálico revestido con apatita mediante un procedimiento electroquímico usando un electrodo de sustrato metálico, un electrodo contador y un electrolito que comprende una solución acuosa que contiene iones calcio e iones fosfato, que comprende realizar varios ciclos de polarización catódica sucesivos que comprenden la polarización en una o más fases a altas densidades de corriente constantes iguales o diferentes. El revestimiento producido contiene cristales de hidroxiapatita y/o esferas de fosfato cálcico amorfo.

El documento DE 19504386 C2 se refiere a un procedimiento electroquímico para producir un revestimiento graduado de fases de fosfato cálcico y fases de óxido metálico sobre implantes metálicos. Los electrodos de sustrato están alternativamente polarizados catódica y anódicamente.

El documento EP 1166804 A2 describe un revestimiento constituido por una matriz de colágeno mineralizada con fosfato cálcico.

El documento WO 03/039609 A1 describe un procedimiento de dos fases para la deposición electroforética de un revestimiento de fosfato cálcico, tal como hidroxiapatita, sobre una prótesis de reemplazo de hueso eléctricamente conductora. En la primera fase el material se trata previamente por ataque electroquímico para disolver una capa superficial delgada de la superficie del sustrato.

El documento DE 100 069 92 A1 se refiere a un procedimiento para revestimiento de un implante con fosfato cálcico que es soluble en el cuerpo. El revestimiento se produce por deposición electrolítica sobre el implante a partir de una solución que comprende calcio y fosfato, se incorporan partículas en dispersión en el revestimiento.

También se describen partículas en dispersión para el revestimiento de implantes en el documento DE 101 131 08 A1. Las partículas tienen forma de nano- o microcápsulas o liposomas, que contienen sustancias antibióticas en su interior y están constituidas por polímeros orgánicos y fosfato cálcico. Estas partículas permitirán la liberación controlada de las sustancias antibióticas desde la superficie del implante.

Se conocen otras estrategias de administración de fármacos para permitir una liberación lenta controlada de sustancias desde la superficie del implante:

El documento WO 03/059407 A1, por ejemplo, se refiere a un implante de titanio o una aleación de titanio con una superficie al menos parcialmente revestida con factor de crecimiento transformante o una hormona sistémica.

El documento DE 4121 043 A1 describe un material sustituto de hueso con una matriz porosa que se impregna con un polipéptido que tiene la actividad biológica de factores de crecimiento de fibroblastos.

El documento DE 101 190 96 A1 se refiere a una superficie de sustrato de poros abiertos con poros interconectados
5 abiertos, con un contenido de poros del 15-50%, que comprende esencialmente un material inorgánico no mineral que está constituido por fases de fosfato cálcico reabsorbibles controlables producidas preferentemente por revestimiento electroquímico que se combina con un revestimiento previo de los sustratos mediante los procedimientos de sol-gel. Las moléculas de adhesión y/o señal se unen covalentemente en un procedimiento separado a grupos de anclaje como acrilato u oligómeros de ácido glutámico o ácido *D,L*-2-amino-5-fosfonopentanoico. Los grupos de anclaje se
10 adsorben por interacciones de fisisorción al fosfato cálcico. La fase de fosfato cálcico está constituida principalmente por la brushita y monetita, que son fases de fosfato cálcico relativamente solubles en agua en comparación con la apatita. La capa de fosfato cálcico se degrada muy rápidamente. Después de 7 días desde la implantación, la capa se degradaba casi completamente. Durante el procedimiento de degradación se libera el péptido. Los péptidos solubles liberados tienen la desventaja de bloquear receptores de la superficie celular que son necesarios para la adhesión
15 celular.

El documento US 6.268.348 B1 se refiere a péptidos sintéticos que mimetizan la conformación necesaria para el reconocimiento y el acoplamiento de especies de unión a colágeno (tales como receptores de superficie celular para colágeno y fibronectina). Los péptidos pueden adsorberse por interacciones físicas débiles a partículas constituidas por
20 hidroxapatita particulada que se aísla de hueso natural. Los péptidos que se adsorben a las partículas por interacciones físicas débiles se liberan de las partículas después de la implantación en el cuerpo. Los péptidos solubles liberados tienen la desventaja de bloquear receptores de superficie celular que son necesarios para la adhesión celular.

Sin embargo, estas estrategias de administración de fármacos, que permitirán una liberación controlada de sustancias desde la superficie del implante, tienen la desventaja de que las sustancias no están unidas de forma estable a la superficie. La unión estable a la superficie, sin embargo, es un requisito previo para la acción con éxito de moléculas de adhesión. Con frecuencia se usan proteínas como factores de crecimiento que no son resistentes a procedimientos de esterilización.

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos implantes con superficies bioactivas mejoradas que eviten las desventajas mencionadas anteriormente.

Objeto de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un implante, en particular para el contacto con hueso o como prótesis dental, con una superficie mejorada. Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la producción del implante.

Descripción de la invención

Mediante un aspecto de la presente invención se proporciona un implante destinado al contacto con tejido blando y/o hueso que comprende:

un material de base que tiene al menos una parte de sus estructuras superficiales a nivel de mm a sub- μ m, preferentemente a nivel de 100 μ m a nm, mientras que la superficie es electroconductora, teniendo al menos en una parte de su superficie un revestimiento que comprende una capa de apatita nanocristalina, mientras que se incorpora parcialmente al menos un péptido en la capa de apatita nanocristalina.

El implante de la invención tiene una superficie biofuncionalizada que promueve la adhesión de células. La adhesión de células a la superficie se apoya particularmente en:

1. la morfología de la superficie con estructuras a nivel de mm a sub- μ m,
2. un revestimiento de apatita nanocristalina delgado que no bloquea la morfología,
3. la incorporación del péptido en el revestimiento de apatita nanocristalina.

La expresión superficie biofuncionalizada en el contexto de la presente invención tiene el significado de una superficie con propiedades biológicas definidas que se obtiene como resultado de la inmovilización de biomoléculas, por ejemplo, péptidos o proteínas en la superficie.

El material de base usado para el implante, que se reviste de acuerdo con la invención, puede ser cualquier material que tenga una superficie electroconductora. Un material preferido es titanio o una aleación de titanio.

El material de base tiene al menos en una parte de su superficie, preferentemente en el área de contacto con el hueso, estructuras a nivel de sub-mm a sub- μ m, preferentemente a nivel de 100 μ m a nm. Las estructuras forman una morfología relativamente compleja y aumentan la rugosidad de la superficie del implante, que es accesible a las células. Esta morfología mejora la adhesión celular por sí misma y refuerza el contacto con el hueso.

Las estructuras a nivel de mm a sub- μ m se generan preferentemente por chorreado con corindón, metalizado por bombardeo de polvo de metal fundido en la superficie, técnicas asistidas por láser, técnicas asistidas por plasma, ataque químico o una combinación de estas técnicas.

En una realización referida, el material de base se trata primero para generar estructuras a nivel sub-mm, preferentemente por chorreado con corindón o por aplicación de pulsos de láser a la superficie. Como alternativa, se generan estructuras a nivel de sub- μ m a mm por metalizado por bombardeo de polvo de metal fundido en la superficie. En una segunda etapa se generan estructuras a nivel de μ m a nm, preferentemente por ataque químico, preferentemente por ataque químico con ácido.

La superficie para el contacto con tejido blando, sin embargo, puede ser relativamente lisa, como metal mecanizado o torneado.

La capa de apatita nanocrystalina en esta superficie con las estructuras a nivel de sub- μ m a mm es homogénea y relativamente delgada, con un espesor preferido inferior a 5 μ m, más preferido inferior a 1 μ m. Este delgado revestimiento no enmascara las estructuras.

La capa está constituida principalmente por hidroxiapatita o hidroxiapatita y fluoroapatita, preferentemente formada por un revestimiento que está constituido por agujas muy finas que tienen una longitud de aproximadamente 200 nm a 500 nm y un diámetro de aproximadamente 20 a 40 nm. En lugar de enmascarar la morfología del material de base, las agujas añaden incluso microestructuras adicionales a nivel sub- μ m.

La capa de apatita nanocrystalina es difícilmente soluble en agua (producto de solubilidad de aproximadamente $5,5 \times 10^{-18}$ (mol/l)¹⁸) y permanece unida estable sobre el implante después de su implantación en el cuerpo.

La incorporación del péptido en la capa de apatita nanocrystalina se consigue por codeposición electroquímica asistida del péptido junto con la apatita sobre la superficie del implante. La codeposición electroquímica asistida se realiza como polarización catódica, durante la que se acumula una capa creciente de apatita nanocrystalina y el péptido se incorpora dentro de la capa creciente de apatita. Mediante esta incorporación en la capa el péptido se une de forma estable a la superficie por interacciones que son mucho más fuertes que la adsorción por interacciones físicas. Sorprendentemente, no son necesarios grupos de anclaje especiales en el péptido para conseguir esta incorporación.

El péptido promueve ventajosamente la adhesión celular de células específicas a la superficie del implante. Para promover la adhesión celular el péptido se escoge de una familia de péptidos sintéticos que mimetizan moléculas, que tienen una conformación necesaria para el reconocimiento y el acoplamiento de moléculas de superficie celular que están presentes en la superficie de las células. En una realización preferida, el péptido se une a un miembro de la familia de la integrina de receptores de superficie celular.

Sorprendentemente, durante el procedimiento de polarización catódica el péptido se integra sólo parcialmente en la capa de apatita cristalina, dejando los restos del péptido, que son importantes para el reconocimiento de moléculas de superficie celular, accesibles para las células.

Los experimentos de células muestran que el péptido unido estable aumenta mucho la acción estimulante de la adhesión celular del implante. Los experimentos de control muestran que el alto índice de adhesión celular que se consigue con el material de implante de acuerdo con la invención no puede alcanzarse por adsorción del péptido a la superficie.

El péptido tiene preferentemente una longitud de 5 a 100, más preferentemente de 10 a 50 aminoácidos. El péptido se obtiene preferentemente por síntesis química usando química de péptidos en fase sólida convencional. Al contrario que las proteínas naturales, los péptidos cortos son resistentes a técnicas de esterilización como irradiación gamma y pueden almacenarse en un entorno seco a temperatura ambiente durante años.

Una realización de la invención es un implante destinado al contacto con el hueso. En esta realización, el péptido tiene preferentemente un efecto osteoconductor, mimetizando la conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de receptores de integrina u otras moléculas de superficie, que están presentes en la superficie de células óseas, preferentemente osteoblastos. Este revestimiento osteoconductor mejora el contacto con el hueso del implante por adhesión de osteoblastos a la superficie del implante y la formación consiguiente de tejido óseo en la superficie del implante.

El término osteoconductor, en el sentido de la presente invención, significa proporcionar una estructura que sirva como estructura guía para que las células óseas, que están presentes en el entorno cercano, se adhieran a la superficie. El término osteoconductor es diferente del término osteoinductor, ya que el término osteoinductor significa inducir la formación de hueso en un tejido, en el que normalmente no están presentes células óseas.

En una realización más preferida el péptido mimetiza el dominio de unión a células del colágeno, preferentemente colágeno de tipo I, de modo que el péptido se une a receptores de colágeno (por ejemplo, integrinas) en células y media la adhesión de células al implante. El dominio de unión a células o unión a integrina del péptido incluye una

ES 2 347 429 T3

secuencia de núcleo que, en condiciones fisiológicas, se pliega en un pliegue beta, estando el pliegue beta formado en -Ile-Ala. Un péptido preferido tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1:

Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Arg-Gly-Val-Val (SEC ID N°: 1).

Esta realización de quince aminoácidos tiene la misma secuencia que una región pequeña particular en la cadena $\alpha 1$ del colágeno. Se escogen péptidos preferidos adicionales del grupo de péptidos con secuencias de aminoácidos de acuerdo con las secuencias siguientes:

Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Arg (SEC ID N°: 2),

Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln (SEC ID N°: 3),

Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Arg (SEC ID N°: 4),

Phe-Gly-Ile-Ala-Gly-Phe (SEC ID N°: 5),

Gly-Ile-Ala-Gly-Gln (SEC ID N°: 6),

Gln-Gly-Ala-Ile-Ala-Gln (SEC ID N°: 7),

Cys-Gly-Ile-Ala-Gly-Cys (SEC ID N°: 8),

Glu-Gly-Ile-Ala-Gly-Lys (SEC ID N°: 9) o:

(X)₀₋₁₅-Gly-Ile-Ala-Gly-(X)₀₋₁₅

representando (X)₀₋₁₅ de 0 a 15 aminoácidos de cualquier clase.

Una realización alternativa de la invención es un implante destinado al contacto con tejido blando. En esta realización, el péptido se escoge de un grupo de péptidos que promueven la adhesión de células a tejido blando, preferentemente queratinocitos o fibroblastos, mimetizando la conformación necesaria para el reconocimiento y el acoplamiento de laminina u otras moléculas superficiales que están presentes en la superficie de queratinocitos o fibroblastos. El revestimiento así producido mejora el contacto con tejido blando del implante por adhesión de células de tejido blando, preferentemente queratinocitos o fibroblastos, a la superficie del implante.

En esta realización, el péptido mimetiza el dominio de unión a células de la laminina, de modo que el péptido se une a receptores de laminina en las células y media la adhesión celular al implante. El dominio de unión a células del péptido incluye preferentemente el motivo Arg-Gly-Asp (RGD) o Ile-Lys-Val-Ala-Val. Se escogen péptidos preferidos del grupo de péptidos con secuencias de aminoácidos de acuerdo con las secuencias siguientes:

(X)₀₋₁₅-Arg-Gly-Asp-(X)₀₋₁₅ o

(X)₀₋₁₅-Ile-Lys-Val-Ala-Val-(X)₀₋₁₅

representando (X)₀₋₁₅ de 0 a 15 aminoácidos de cualquier clase.

Se escogen péptidos más preferidos del grupo de péptidos con secuencias de aminoácidos de acuerdo con las secuencias siguientes SEC ID N°: 10 a 13:

Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly (SEC ID N°: 10)

Glu-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr (SEC ID N°: 11)

Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro (SEC ID N°: 12)

Gly-Thr-Pro-Gly-Pro-Gln-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Gln-Arg-Gly-Val (SEC ID N°: 13).

Una realización especial de la invención es un implante destinado tanto a contacto con tejido blando como con hueso, como una prótesis dental. En esta realización, el implante se reviste en el área destinada al contacto con el hueso con una capa de apatita nanocristalina en la que se incorpora un péptido osteoconductor para promover la adhesión de células de tejido óseo, preferentemente osteoblastos. El área del implante que está destinada al contacto con el tejido blando se reviste con un segundo péptido que promueve la adhesión de células de tejido blando, preferentemente queratinocitos o fibroblastos.

Preferentemente, el implante para el contacto con tejido blando y hueso se caracteriza por que el material de base tiene en la parte de la superficie destinada al contacto con el hueso estructuras a nivel de sub-mm a sub- μm , y mientras la parte de la superficie para el contacto con tejido blando tiene una estructura superficial diferente.

Mediante otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para producir un implante con una superficie destinada al contacto con tejido blando y/o hueso. De acuerdo con la invención, este objetivo se lleva a cabo mediante un procedimiento que comprende las etapas de revestir la superficie con una capa que comprende apatita nanocristalina, en el que al menos un péptido que tiene un efecto promotor de la adhesión celular mimetizando una conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de moléculas de superficie celular, preferentemente integrinas, se incorpora parcialmente en al menos una parte de la capa de apatita nanocristalina, dejando los restos del péptido que son importantes para el reconocimiento de moléculas de superficie celular accesibles a las células, en el que la capa de apatita nanocristalina está constituida por hidroxiapatita o hidroxiapatita y fluoroapatita, estando constituida por agujas muy finas que tienen una longitud de aproximadamente 200 nm a 500 nm y un diámetro de aproximadamente 20 a 40 nm, que incluye proporcionar un material de base con una superficie electroconductora que tiene al menos en una parte de su superficie estructuras a nivel de sub-mm a sub- μm , que se generan por chorreado con corindón, o metalizado por bombardeo de polvo de metal fundido en la superficie, o técnicas asistidas por láser, o técnicas asistidas por plasma, o ataque químico o una combinación de estas técnicas, proporcionar una solución de electrolito que contiene al menos iones calcio e iones fosfato y que tiene un pH que es de $6,4 \pm 0,4$, proporcionar un electrodo contador en la solución de electrolito; poner el material de base al menos parcialmente en la solución de electrolito; y aplicar una corriente eléctrica entre el electrodo contador y el material de base, de modo que el material de base actúe como cátodo.

Dicho procedimiento electroquímicamente asistido proporciona el revestimiento de la superficie de un implante con una capa que está constituida por apatita, en la que se incorpora parcialmente un péptido.

En una realización de la invención el presente procedimiento usa:

- 1.) un material de base (sustrato) que tiene al menos en una parte de su superficie estructuras a nivel de mm a sub- μm , mientras que la superficie es electroconductora,
- 2.) un electrolito que contiene el péptido, y iones calcio e iones fosfato, y que tiene un pH que es ligeramente ácido o aproximadamente neutro,
- 3.) un electrodo contador en el electrolito.

Estas estructuras a nivel de mm a sub- μm se generan preferentemente por chorreado con corindón, o metalizado por bombardeo de polvo de metal fundido en la superficie, o técnicas asistidas por láser, como aplicación de pulsos de láser, o técnicas asistidas por plasma, o ataque químico o una combinación de estas técnicas.

Mediante este pretratamiento la superficie del implante obtiene una morfología relativamente compleja y aumenta la rugosidad de la superficie, que está accesible a las células. Esta morfología mejora la adhesión celular por sí misma y refuerza el contacto con el hueso.

En una realización preferida el material de base se trata primero para generar estructuras a nivel sub-mm, preferentemente por chorreado con corindón o por aplicación de pulsos de láser a la superficie. Como alternativa, se generan estructuras a nivel de sub- μm a mm por metalizado por bombardeo de polvo de metal fundido en la superficie. En una segunda etapa se generan estructuras a nivel nm preferentemente por ataque químico, preferentemente ataque químico con ácido. La etapa de ataque químico con ácido se realizó preferentemente a una temperatura por encima de 40°C con una mezcla de ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico.

El procedimiento electroquímicamente asistido conduce ventajosamente a una deposición controlada y muy homogénea de apatita en la superficie. El espesor de la capa depositada puede controlarse mediante la densidad de corriente usada para la polarización y el tiempo de polarización.

La deposición controlada es importante para el procedimiento de la invención para generar un revestimiento homogéneo sobre la superficie, que sea relativamente delgado, con un espesor preferido inferior a $5 \mu\text{m}$, y que no enmascare las estructuras a nivel de sub- μm a mm.

Esta deposición controlada de capas delgadas homogéneas no puede conseguirse por técnicas no electroquímicamente asistidas comúnmente usadas para la deposición de apatita en superficies.

ES 2 347 429 T3

El procedimiento electroquímicamente asistido se realiza preferentemente entre 10°C y 45°C, más preferentemente entre temperatura ambiente y 42°C, más preferentemente entre 30°C y 38°C. Este intervalo de temperatura preserva ventajosamente la conformación biológicamente activa del péptido.

El implante se pone en el electrolito y se aplica una corriente eléctrica entre el electrodo contador y el implante, de modo que el material de base actúa como cátodo. Este procedimiento de una etapa conduce a una deposición directa de apatita nanocristalina. La polarización catódica se realiza preferentemente galvanostáticamente. La densidad de corriente se selecciona preferentemente para que sea de 0,1 mA/cm² a 20 mA/cm², más preferentemente de entre 2 mA/cm² a 15 mA/cm².

Para la ejecución del procedimiento de acuerdo con la invención se prefiere una disposición de dos electrodos, en la que un material inerte como una lámina de platino actúa como el electrodo contador y el material de base como cátodo. Se usa una celda termostáticamente controlada como celda de electrolito. En una realización alternativa de la invención se usa una disposición de tres electrodos, en la que un electrodo de calomel saturado actúa como electrodo de referencia adicional.

Por preferencia se aplica la corriente eléctrica en pulsos, con una longitud de pulso favorita de entre 2 y 10 segundos. Las pausas entre los pulsos se escogen preferentemente en el mismo intervalo. En una realización, 5 segundos de corriente vienen seguidos de 5 segundos sin corriente.

Durante el procedimiento electroquímico se forman burbujas de hidrógeno. Para mejorar la homogeneidad de la capa de apatita formada, las burbujas de gas se eliminan preferentemente de la superficie del material de base por movimiento del sustrato en el electrolito no agitado.

En una realización preferida del procedimiento, la homogeneidad de la capa de apatita formada se mejora adicionalmente por combinación de la aplicación de la corriente en pulsos con el movimiento del sustrato. La aplicación de pulsos y el movimiento pueden realizarse de forma subsiguiente o en paralelo, preferentemente primero se aplica un pulso de corriente y posteriormente la muestra se mueve.

El electrolito usado para la polarización catódica es un medio polar, en el que se disuelven iones calcio e iones fosfato.

El péptido está presente en el electrolito, preferentemente en una concentración de 1 µg/ml a 10 mg/10 ml, más preferentemente de 100 µg/ml a 500 µg/ml. Para mantener baja la cantidad de péptido usado, el material de base preferentemente no se lava y no se seca entre la aplicación de los pulsos de polarización individuales.

Durante el procedimiento de polarización catódica, se construye una capa de apatita nanocristalina y el péptido se incorpora dentro de la capa en crecimiento. Mediante esta incorporación, el péptido se une de forma estable a la superficie por interacciones que son mucho más fuertes que la adsorción.

Sorprendentemente, durante el procedimiento de polarización catódica el péptido se integra sólo parcialmente en la capa, dejando el extremo beta, que es importante para reconocimiento de receptores de colágeno, accesible para que se adhieran las células al péptido.

Los experimentos de células muestran que el péptido unido de forma estable aumenta mucho en la acción estimulante de la adhesión celular del material de implante. A partir de estos resultados, puede concluirse que el dominio del péptido, que es importante para el reconocimiento de receptores de colágeno, está todavía accesible después de la incorporación en la capa de apatita.

En una realización alternativa de la invención el péptido no se disuelve en el electrolito, sino que se deposita en la superficie del material de base por aplicación de una solución de péptido al material de base, seguida de una etapa de secado. Mediante este pretratamiento la superficie del implante se reviste previamente con el péptido, que se une débilmente a la superficie. El material de base previamente revestido se pone ahora en el electrolito y se realiza la polarización catódica como se describe. Al poner el material de base en el electrolito el péptido se disuelve lentamente, conduciendo a un gradiente de concentración del péptido, con la mayor concentración de péptido en la superficie del material de base. Para esta realización del procedimiento son necesarias menores cantidades de péptido en comparación con la realización en la que se disuelve en el electrolito.

En una realización particular del procedimiento de la invención el material de base se reviste previamente con una capa de apatita antes de que se realice la codeposición electroquímicamente asistida de péptido y apatita. Este revestimiento previo es especialmente preferido cuando el péptido no se disuelve en el electrolito sino que se deposita en la superficie antes de la polarización.

Preferentemente, la proporción de la concentración de los iones calcio y fosfato en el electrolito usado para la polarización catódica se selecciona de modo que sea equivalente a sus concentraciones en la hidroxiapatita, dando como resultado una proporción molar de Ca:PO₄ de 1:1 a 2:1, preferentemente de 1,67:1. En una realización preferida de la invención, el electrolito es una solución acuosa de 1 mmol/litro a 2 mmol/litro de CaCl₂ y de 0,5 a 1 mol de

ES 2 347 429 T3

fosfato alcalino, como KH_2PO_4 , por mol de calcio. En realizaciones alternativas de la invención se usan otras sales de calcio fácilmente solubles y fosfatos, como fosfato de amonio.

Para la generación de una capa que contiene fluoroapatita, una sal de fluoruro soluble en agua, preferentemente fluoruro sódico, se disuelve en el electrolito, preferentemente a una concentración del 5% al 30% de la concentración de fosfato.

El valor de pH se ajusta preferentemente entre pH 4 y pH 7,5 por medio de una solución de NH_4OH diluida. En una aplicación preferida de la invención, el pH durante la polarización catódica es un pH de $6,4 \pm 0,4$.

En una realización especial del procedimiento de la invención se revisten distintas partes del implante con diferentes péptidos. Esto se consigue preferentemente por inserción del material de base en una primera etapa sólo parcialmente en el electrolito que contiene el primer péptido y realización de un primer procedimiento de polarización catódica. Después, el material de base se gira y se inserta el otro lado en un segundo electrolito que contiene el segundo péptido y se realiza un segundo procedimiento de polarización catódica.

Como alternativa, ambos péptidos se depositan primero en diferentes partes del material de base. En este caso, la polarización catódica puede realizarse en un procedimiento.

La invención se explica en más detalle mediante los ejemplos siguientes, que son simplemente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplo 1

Un disco hecho de titanio puro al 99,7% y un diámetro de 13 mm, un espesor de 2 mm se chorrea con corindón, se somete a ataque químico con ácido, se limpia en alcohol, se aclara en agua desionizada y se seca con un ventilador.

Se prepara un electrolito con una concentración de calcio de 1,66 mmol/litro (de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) y una concentración de fosfato de 1 mmol/litro (de KH_2PO_4) dando como resultado una proporción de $\text{Ca}:\text{PO}_4 = 1,67:1$. En este electrolito el péptido con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 1 se disuelve en una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$.

El electrolito se pone en una celda de vidrio de doble pared calentada a 36°C y el pH se ajusta a pH = 6,4 por adición de una solución de NH_4OH concentrado en gotas.

Se prepara una disposición de tres electrodos. Se usa un electrodo de calomel saturado como electrodo de referencia. El electrodo contador es una lámina de platino. El disco de titanio forma el electrodo de trabajo. Después de que se prepare esta disposición, se enchufa un galvanostato y se realiza la polarización catódica de la muestra de titanio. Para la polarización galvanostática se aplican pulsos con una densidad de corriente $I = 10 \text{ mA cm}^{-2}$ durante 120 min. Cada pulso tiene una longitud de 5 s y venía seguido de una pausa de 5 s. Durante este procedimiento de deposición la muestra se mueve continuamente en el electrolito.

La muestra se retira del electrolito, se aclara con agua desionizada y se seca con un ventilador. La capa depositada tiene un aspecto amarillo blanquecino, se desarrolla de forma uniforme y tiene una buena unión de superficies de contacto. Las investigaciones llevadas a cabo con un microscopio electrónico de barrido pusieron de manifiesto un revestimiento denso constituido por aglomerados de agujas muy finas que tenían una longitud de aproximadamente 500 nm y un diámetro de aproximadamente 20 a 40 nm. El análisis de la composición elemental por medio de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier dio una proporción de Ca/P de la fase en el revestimiento igual a la de la hidroxiapatita comercial. El análisis de difracción de rayos X verificó que la fase era de hidroxiapatita.

Ejemplo 2

La eficacia de la adhesión celular a la superficie revestida de acuerdo con el Ejemplo 1 se ensayó en experimentos de células y se comparó con superficies no revestidas o superficie revestidas por otros procedimientos.

Se compararon los materiales siguientes:

1. no revestido
2. no revestido, esterilización por irradiación gamma
3. péptido (SEC ID N°: 1) adsorbido desde una solución 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a la superficie no revestida
4. como 3. + esterilización por irradiación gamma
5. revestido con HAP + péptido (SEC ID N°: 1) adsorbido desde una solución 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$

ES 2 347 429 T3

6. como 5. + esterilización por irradiación gamma

7. revestido con HAP en electrolito que contiene $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ (SEC ID N°: 1)

8. como 7. + esterilización por irradiación gamma.

El material no revestido de acuerdo con los N° 1 y 2 es similar al Ejemplo 1, un disco hecho de titanio puro al 99,7% y un diámetro de 13 mm, un espesor de 2 mm se chorrea con corindón, se somete a ataque químico con ácido, se limpia en alcohol, se aclara en agua desionizada y se seca con un ventilador.

El material de acuerdo con los N° 3 y 4 se trató como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero sin realizar la polarización catódica, lo que da como resultado que el péptido se adsorba simplemente desde la solución ($200 \mu\text{g/ml}$) a la superficie no revestida.

El material de acuerdo con los N° 5 y 6 se revistió primero con HAP tratado como se describe en el Ejemplo 1, pero dejando el péptido fuera del electrolito.

Después de la polarización catódica, se añadieron $200 \mu\text{g/ml}$ de péptido al electrolito y la muestra se incubó durante otros 60 min a 36°C sin realizar la polarización catódica.

La muestra incubada de esta forma se aclaró posteriormente y se secó como se describe en el Ejemplo 1.

El material de acuerdo con los N° 7 y 8 se trató exactamente como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Para el material de acuerdo con los N° 2, 4, 6, 8 se realizó una esterilización por irradiación gamma como última etapa (después de revestimiento, aclarado, secado) a temperatura ambiente con una dosis de 25 kGy.

Para los experimentos de células se cultivaron osteoblastos primarios de bóveda craneana de rata durante 24 h en medio MEM de Dulbecco (DMEM) sin suero (Sigma-Aldrich, Munich, Alemania) complementado con 3H-Timidina en materiales con superficies tratadas como se describe en los N° 1 a 8.

Los materiales se retiraron del cultivo de células y se aclararon con Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS). El índice de adhesión celular se midió por recuento de escintilación.

1. no revestido	13
2. revestido, esterilizado por irradiación gamma	17
3. péptido adsorbido desde una solución $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ a superficie no revestida	18
4. como 3. + esterilizado por irradiación gamma	17
5. revestido con HAP + péptido adsorbido desde una solución $200 \mu\text{g ml}^{-1}$	27
6. como 5. + esterilizado por irradiación gamma	15
7. revestido con HAP en electrolito que contiene péptido $200 \mu\text{g ml}^{-1}$	54
(EJEMPLO 1)	
8. como 7. + esterilizado por irradiación gamma	52

Estos resultados se interpretan de la forma siguiente:

1. El revestimiento con HAP con incorporación del péptido en el electrolito durante el procedimiento de polarización catódica de acuerdo con el Ejemplo 1 (N° 7 y 8) tiene el mayor índice de adhesión de osteoblastos (52% y 54%). Esto demuestra el excelente efecto promotor de la adhesión celular del revestimiento de la invención.
2. La esterilización por irradiación gamma no tiene un efecto negativo significativo sobre el revestimiento de la invención (N° 7 en comparación con N° 8).
3. La adsorción de péptido a la superficie no revestida (N° 3 y 4) no mejora significativamente la adhesión celular en comparación con la superficie no revestida (N° 1 y 2).
4. Una superficie revestida con HAP que tiene un péptido adsorbido (N° 5) sólo muestra un efecto promotor de la adhesión celular muy reducido que se pierde después de la irradiación gamma (N° 6). El índice de adhesión celular que se consigue mediante el revestimiento de la invención (N° 7 y 8) es mucho mayor.

Sorprendentemente, durante el procedimiento de polarización catódica de la invención el péptido se integra sólo parcialmente en la capa, dejando el extremo beta, que es importante para el reconocimiento del péptido por receptores de colágeno, accesible para que las células se adhieran al péptido.

- 5 La adsorción de péptido a la superficie revestida con HAP empeora incluso el índice de adhesión celular en comparación con un revestimiento con HAP sin adsorción de péptido (no se muestran los datos).

Ejemplo 3

- 10 Un disco hecho de titanio puro al 99,7% se trató como se describe en el Ejemplo 1 pero por incorporación de 500 $\mu\text{g/ml}$ del péptido que contiene el motivo Ile-Lys-Val-Ala-Val de acuerdo con la SEC ID N°: 13 en lugar de un péptido con una secuencia de acuerdo con la SEC ID N°: 1 en el electrolito. Para la polarización galvanostática se aplica una densidad de corriente $I = 10 \text{ mA cm}^{-2}$ a 36°C durante 60 min sin pulsos.

- 15 Para los experimentos de células, se cultivaron células HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados obtenidos del DKFZ-German Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania) durante 24 h en medio MEM de Dulbecco (DMEM) sin suero complementado con 3H-Timidina sobre el disco de titanio revestido.

- 20 Se realizaron los experimentos de control respectivos, como se describe en el Ejemplo 2, usando el péptido. Los resultados son comparables al Ejemplo 2.

- 25 El revestimiento con HAP con incorporación del péptido que contiene el motivo Ile-Lys-Val-Ala-Val de acuerdo con la SEC ID N°: 13 en el electrolito durante el procedimiento de polarización catódica tiene el mayor índice de adhesión de queratinocitos. Esto demuestra el excelente efecto promotor de la adhesión celular de revestimiento de la invención.

- 30 Sorprendentemente, durante el procedimiento de polarización catódica de la invención el péptido se integra sólo parcialmente en la capa, dejando motivo Ile-Lys-Val-Ala-Val, que es importante para el reconocimiento por queratinocitos, accesible para que las células se adhieran al péptido.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un implante con una superficie destinada al contacto con tejido blando y/o hueso que comprende un material de base que tiene al menos en una parte de su superficie estructuras a nivel de sub-mm a sub- μ m, mientras que la superficie es electroconductora, teniendo en su superficie un revestimiento que comprende una capa de apatita nanocristalina, mientras que al menos un péptido, en el que el péptido tiene un efecto promotor de la adhesión celular mimetizando una conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de moléculas de superficie celular, preferentemente integrinas, se incorpora parcialmente por codeposición electroquímicamente asistida en al menos una parte de la capa de apatita nanocristalina, dejando los restos del péptido que son importantes para el reconocimiento de moléculas de superficie celular accesibles a las células, en el que la capa de apatita nanocristalina está constituida por hidroxiapatita o hidroxiapatita y fluoroapatita, estando constituida por agujas muy finas que tienen una longitud de aproximadamente 200 nm a 500 nm y un diámetro de aproximadamente 20 a 40 nm.
2. Un implante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido tiene un efecto osteoconductor mimetizando una conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de moléculas de superficie, que están presentes en la superficie de células de tejido óseo, preferentemente osteoblastos.
3. Un implante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido promueve la adhesión de células de tejido blando, preferentemente queratinocitos o fibroblastos, mimetizando una conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de moléculas de superficie, que están presentes en la superficie de células de tejido blando, preferentemente queratinocitos o fibroblastos.
4. Un implante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una primera parte de la capa de apatita contiene un primer péptido, que tiene un efecto osteoconductor mimetizando una conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de moléculas de superficie que están presentes en la superficie de células de tejido óseo, preferentemente osteoblastos, y una segunda parte de la capa de apatita contiene un segundo péptido que promueve la adhesión de células de tejido blando, preferentemente queratinocitos o fibroblastos, mimetizando una conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de moléculas de superficie que están presentes en la superficie de células de tejido blando, preferentemente queratinocitos o fibroblastos.
5. Un implante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido mimetiza una conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de receptores de unión a colágeno I.
6. Un implante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el péptido contiene un motivo Gly-Ile-Ala-Gly o Arg-Gly-Asp o Ile-Lys-Val-Ala-Val, o tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de acuerdo con las SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 13.
7. Un implante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, destinado al contacto con tejido blando y hueso, en el que el material de base tiene en la parte de la superficie destinada al contacto con el hueso estructuras a nivel de sub-mm a sub- μ m, y mientras la parte de la superficie para el contacto con tejido blando tiene una estructura de superficie diferente.
8. Un procedimiento para producir un implante con una superficie destinada al contacto con tejido blando y/o hueso, que comprende la etapa de: revestir la superficie con una capa que comprende apatita nanocristalina, en la que al menos un péptido, en la que el péptido tiene un efecto promotor de la adhesión celular mimetizando una conformación necesaria para el reconocimiento y acoplamiento de moléculas de superficie celular, preferentemente integrinas, se incorpora parcialmente en al menos una parte de la capa de apatita nanocristalina, dejando los restos del péptido que son importantes para el reconocimiento de moléculas de superficie celular accesibles a las células, en el que la capa de apatita nanocristalina está constituida por hidroxiapatita o hidroxiapatita y fluoroapatita, estando constituida por agujas muy finas que tienen una longitud de aproximadamente 200 nm a 500 nm y un diámetro de aproximadamente 20 a 40 nm, que incluye proporcionar un material de base con una superficie electroconductora que tiene al menos en una parte de su superficie estructuras a nivel de sub-mm a sub- μ m, que se generan por chorreado con corindón, o metalizado por bombardeo de polvo de metal fundido en la superficie, o técnicas asistidas por láser, o técnicas asistidas por plasma, o ataque químico o una combinación de estas técnicas, proporcionar una solución de electrolito que contiene al menos iones calcio e iones fosfato y que tiene un pH que es de $6,4 \pm 0,4$, incluyendo proporcionar un electrodo contador en la solución de electrolito; poner el material de base al menos parcialmente en la solución de electrolito; aplicar una corriente eléctrica entre el electrodo contador y el material de base, de modo que el material de base actúe como cátodo.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la solución de electrolito contiene además el péptido.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que se deposita al menos un péptido en la superficie.
11. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, realizado a una temperatura de entre 10°C y 45°C, preferentemente de 25°C a 42°C.

ES 2 347 429 T3

12. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el material de base se reviste previamente con una capa de apatita.

5 13. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que se aplican diferentes péptidos a distintas partes del material de base.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 347 429 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Friadent GmbH

5 <120> Implante con una superficie biofuncionalizada y procedimiento para su producción

<130> P12135EP

10 <160> 13

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 15

<212> PRT

20 <213> artificial

<400> 1

25 Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg Gly Val Val
 1 5 10 15

<210> 2

<211> 9

30 <212> PRT

<213> artificial

<400> 2

35 Gly Pro Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg
 1 5

<210> 3

40 <211> 6

<212> PRT

<213> artificial

45 <400> 3

 Gln Gly Ile Ala Gly Gln
 1 5

50 <210> 4

<211> 7

<212> PRT

55 <213> artificial

<400> 4

60 Gln Gly Ile Ala Gly Gln Arg

65

1

5

ES 2 347 429 T3

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <400> 5
 10 Phe Gly Ile Ala Gly Phe
 1 5

 <210> 6
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> artificial

 <400> 6
 20 Gly Ile Ala Gly Gln
 1 5

 25 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <400> 7

 Gln Gly Ala Ile Ala Gln
 1 5
 35
 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> artificial

 <400> 8
 45 Cys Gly Ile Ala Gly Cys
 1 5

 <210> 9
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> artificial

 <400> 9
 55 Glu Gly Ile Ala Gly Lys
 1 5

 60 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 65

ES 2 347 429 T3

<400> 10

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10

5 <210> 11

<211> 6

<212> PRT

10 <213> artificial

<400> 11

Glu Pro Arg Gly Asp Thr
15 1 5

<210> 12

<211> 6

20 <212> PRT

<213> artificial

<400> 12

25 Gly Arg Gly Asp Ser Pro
1 5

<210> 13

30 <211> 15

<212> PRT

<213> artificial

35 <400> 13

Gly Thr Pro Gly Pro Gln Ile Lys Val Ala Val Gln Arg Gly Val
1 5 10 15

40

45

50

55

60

65