ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901991717A1

Publication Date

20130428

Applicant

DENTAL TECH S.R.L.

Title

IMPIANTO DENTALE CON RIVESTIMENTO ANTIMICROBICO.

Front page automatically generated by WIPO

TITOLO: IMPIANTO DENTALE CON RIVESTIMENTO ANTIMICROBICO

RICHIEDENTE: DENTAL TECH

Descrizione

Campo dell'invenzione

La presente invenzione mette a disposizione protesi biomedicali osteointegrate, in particolare impianti dentali, con superficie antimicrobica.

Stato dell'arte

Il titanio e le sue leghe sono materiali largamente impiegati in implantologia grazie alle loro caratteristiche meccaniche e di biocompatibilità. Quando esposto all'ossigeno, il titanio tende ad ossidarsi incrementando le sue caratteristiche che ne favoriscono l'osteointegrazione.

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 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 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 inducono la neosintesi di osso). Il processo di osteointegrazione può essere considerato ultimato in circa 60 giorni, corrispondenti al tempo di consolidamento delle fratture.

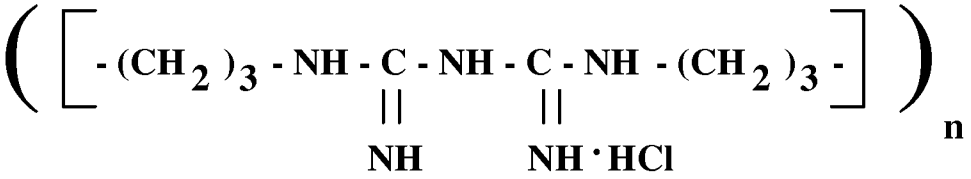
Per quanto riguarda gli impianti endoossei, un ruolo importante viene rivestito dall'effetto del materiale di cui sono composti e dal design dell'impianto stesso. Entrambi i fattori infatti influiscono in vario grado sul processo di osteointegrazione.

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.

Un problema che riguarda la fase precedente all'impianto di una protesi dentale, sia durante la sua conservazione che la manipolazione, è il concreto pericolo di contaminazione della protesi stessa da parte di cariche microbiche presenti nell'ambiente. E' noto infatti che negli studi medici e dentistici sono normalmente presenti batteri di varia natura, che possono quindi contaminare l'impianto e trasmettersi al paziente con conseguenze facilmente immaginabili.

E' quindi desiderabile mantenere i dispositivi prostetici liberi da ogni contaminazione microbica per un periodo di tempo più prolungato possibile.

Il prodotto PHMB è una miscela di poliesametilen biguanide con un peso molecolare medio di circa 2500 Da ed avente la seguente formula di struttura:



Questo prodotto è un potente battericida con un ampio spettro d'azione e una bassa tossicità. Il probabile meccanismo d'azione della PHMB consiste nella distruzione della membrana cellulare della specie microbica.

PHMB stato utilizzata con successo come disinfettante nell'industria alimentare e nella disinfezione delle piscine. E' stata anche esplorata la sua applicazione come biocida nei risciacqui orali e come rivestimento di garze per ferite.

Ad oggi non sono noti report sulla insorgenza di resistenze di ceppi batterici sebbene le resistenze indotte dalla bis-biguanide clorexidina sono ben noti.

E' stato anche riportato il trattamento di fibre di cellulose con PHMB, seguito da un trattamento con un

acido organico forte per aumentare la durata del rivestimento ed evitare l'ingiallimento delle fibre (Payne, J. D., United States Patent no 5,700,742). Successivamente, Payne and Yates estesero il trattamento delle fibre sintetiche con PHMB utilizzando una resina che poteva reticolare in presenza di un catalizzatore (Payne, J. D., Yates, J. E., EP 1 697 577 A1). A causa della natura cationica della PHMB la sua adesione alle fibre di cotone è molto probabilmente legata alla formazione di legami a idrogeno. I gruppi carbossilici presenti sulle fibre di cotone possono ovviamente essere coinvolti in questa interazione. La colorazione delle fibre con coloranti che contengono funzionalità anioniche del tipo SO_3^- facilita l'adsorbimento della PHMB per interazione elettrostatica. Tuttavia il forte legame ionico ha lo svantaggio di limitare il rilascio della PHMB alla specie microbica, riducendo l'efficacia battericida e fungicida.

Per applicazioni sui tessuti la PHMB viene normalmente utilizzata in soluzioni acquose di concentrazioni variabili dal 2 al 8% in dipendenza della durata dell'effetto antimicrobico che si vuole ottenere. Nel caso di tessuti monouso le concentrazioni di PHMB

nelle soluzioni utilizzate nei trattamenti sono normalmente nell'intervallo 0.25-1%.

Sommario dell'invenzione

Un oggetto dell'invenzione è quello di mettere a disposizione dispositivi implantari in titanio o sue leghe che associno alle proprietà osteointegrative un'attività antimicrobica.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione sono impianti dentali, tipicamente viti per impianto, comprendenti un rivestimento avente attività anti microbica.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è quello di mettere a disposizione un dispositivo implantare in titanio o sue leghe avente un rivestimento con attività antimicrobica, in cui tale attività antimicrobica viene mantenuta per un lungo periodo di tempo, preferibilmente per almeno 5 giorni dalla deposizione del rivestimento.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione sono dispositivi implantari in titanio o sue leghe comprendenti sulla loro superficie un rivestimento di PHMB (poliesametilen biguanide) ad attività antimicrobica.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è quello di mettere a disposizione un procedimento per realizzare un dispositivo implantare come sopra definito.

L'invenzione riguarda pertanto dispositivi implantari ed un procedimento per la loro produzione, come delineati nelle annesse rivendicazioni, le cui definizioni formano parte integrante della presente descrizione.

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

Figura 1 mostra un grafico che riporta il contenuto di C e N in un impianto a diversi tempi di trattamento secondo l'invenzione;

Figure 2-5 mostrano gli spettri XPS relativi alla superficie dell'impianto ai tempi di trattamento di figura 1;

Figure 6A, 6B e 6C mostrano immagini di piastre dove sono stati posti gli impianti dentali trattati con la procedura dell'invenzione e non trattati dopo il contatto con la miscela di prova contenente le specie batteriche *S. aureus, E. coli, E. hirae, P. aeruginosa* e la specie fungina *C. albicans*.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

L'invenzione si basa sulla sorprendente scoperta che PHMB è in grado di formare un rivestimento stabile sulla

superficie di un dispositivo implantare in titanio o sue leghe.

Senza essere legati ad una particolare teoria, si può ipotizzare che la formazione di un film stabile di poliesametilen biguanide (PHMB) sulla superficie in titanio possa avvenire sia per donazione diretta dei doppietti elettronici presenti sugli atomi di azoto della PHMB agli orbitali *d* vuoti localizzati sul Titanio, sia per legame a idrogeno con lo strato di ossido eventualmente presente sulla sua superficie.

Un oggetto dell'invenzione è pertanto un dispositivo implantare in titanio o sue leghe comprendente sulla sua superficie un rivestimento di poliesametilen biguanide.

La poliesametilen biguanide (PHMB) è un prodotto commerciale, disponibile sia come solido che come soluzione.

Il dispositivo implantare è preferibilmente un impianto dentale quale una vite dentale.

Il dispositivo dell'invenzione può essere realizzato mendiante un procedimento che prevede le seguenti fasi:

a) mettere a disposizione un dispositivo implantare in titanio o sue leghe;

b) immergere il dispositivo implantare in una soluzione contenente PHMB per un tempo predeterminato;

c) opzionalmente, lavare la superficie trattata del dispositivo implantare;

d) essiccare la superficie del dispositivo implantare.

In una forma di realizzazione, la soluzione della fase b) contenente PHMB è una soluzione idroalcolica. Secondo una realizzazione preferita, tale soluzione idroalcolica contiene alcool etilico in quantità compresa tra 20% e 60% v/v.

In alcune forme di realizzazione, la soluzione di PHMB della fase b) contiene PHMB in una concentrazione compresa tra 2% e 10% in peso.

In alcune forme di realizzazione, il tempo di permanenza del dispositivo implantare nella soluzione di PHMB della fase b) è compreso tra 10 e 300 minuti.

In alcune forme di realizzazione, la fase c) di lavaggio comprende il lavaggio con un alcol, preferibilmente con alcol etilico.

In alcune forme di realizzazione, la fase d) di essiccamento è condotta mediante flusso d'aria a temperature comprese fra 20 e 60°C.

La quantità di PHMB che riveste l'impianto dipende sia dalla concentrazione della soluzione che dai tempi di trattamento, essendo inteso che maggiori concentrazioni e

tempi più lunghi permettono il rivestimento dell'impianto con una maggiore quantità di PHMB.

L'impianto così trattato mantiene per diversi giorni una condizione di sterilità anche se viene lasciato in presenza dei contaminanti microbici normalmente presenti negli ambulatori medici e dentistici.

PARTE SPERIMENTALE

Analisi XPS di impianti in titanio trattati con soluzioni alcoliche di PHMB

L'analisi XPS della superficie evidenzia in modo chiaro l'avvenuto grafting superficiale della sostanza organica, testimoniato dall'aumento delle specie N e C, ben superiore alle concentrazioni atomiche già presenti sul bianco.

Il tempo di rivestimento a 5 ore non modifica sensibilmente le concentrazioni atomiche delle specie N e C, già rivelate dopo 3 ore di rivestimento.

La tabella I seguente riporta i dati ottenuti espressi in concentrazione atomica percento (at. %).

ATOMIC CONCENTRATION

	bianco	EtOH 1 ora	EtOH 3 ore	EtOH 5 ore
C1	23,33	45,33	58,05	57,73
N1	6,89	14,70	24,78	25,29
O1	45,97	24,35	7,43	6,77
Ti1	10,20	2,85	0,00	0,00
Si2	9,78	8,09	4,20	4,37
Al2	3,03	1,18	0,00	0,00
Cl1	0,58	3,44	5,54	5,84
Zn1	0,22	0,06	0,00	0,00
	100,00	100,00	100,00	100,00

Nella tabelle I l'indicazione ETOH 1 ora, 3 ore e 5 ore fa riferimento ai tempi di immersione degli impianti in titanio in soluzioni aventi la seguente composizione: alcool etilico 50%, acqua 40%, PHMB 10%. In tutti i casi, dopo la fase di adsorbimento della PHMB, è stato effettuato un lavaggio dell'impianto attraverso immersione in alcol etilico per un minuto e il successivo essiccamento in corrente d'aria.

Si osserva che la superficie del campione bianco evidenzia la presenza di contaminazioni di Al e Zn, che vengono ricoperte dal componente organico depositato, così come nel caso del titanio (Ti) che non risulta più

visibile dopo 3 ore di trattamento. Sono presenti anche Si e Cl, quest'ultimo aumenta con la deposizione del componente organico.

Il grafico in figura 1 evidenzia l'andamento delle sole specie di C e N, mentre nelle figure 2, 3, 4 e 5 sono mostrati i relativi spettri XPS (X-Ray Photoelectron Spectroscopy).

Valutazione dell'attività antimicrobica degli impianti in titanio trattati con PHMB.

Gli impianti dentali trattati con una soluzione di PHMB al 10% in soluzione idroalcolica, come descritto in precedenza, e lasciati in immersione per tempi pari a 60 e 120 min, seguito da lavaggio in alcol etilico ed essiccamento in corrente d'aria sono stati sottoposti all'analisi microbiologica al fine di valutare l'attività microbicida del rivestimento realizzato sulla loro superficie.

L'attività antimicrobica è stata valutata nei confronti dei seguenti microrganismi: *Escherichia coli, Staphyloccoccus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus hirae, Candida albicans*.

PROCEDURA SPERIMENTALE

1. SISTEMA DI SAGGIO

Microrganismi

Identificazione

Sono stati utilizzati i seguenti ceppi test:

Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15442
Staphylococcus aureus	ATCC 6538
Escherichia coli	ATCC 10536
Enterococcus hirae	ATCC 10541
Candida albicans	ATCC 10231

Centro di provenienza

I ceppi provengono dal Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Sezione di Microbiologia, dell'Università di Ferrara.

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 e conservati in frigorifero a 4°C ± 2°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°C ± 2°C.

2. TERRENI COLTURALI E REAGENTI

2.1 Terreni

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

2.2 Diluente

Triptone, digestione

pancreatica di caseina	1.0 g	OXOID
NaCl	8.5 g	MERCK
Acqua distillata q.b.	1000 ml	

3. APPARECCHIATURA

- Stufa per la sterilizzazione a secco KW
- Autoclave a vapore COLUSSI
- Termostato MEMMERT
- Agitatore Vortex VELP
- Cronometro VWR
- Micropipette THERMO SCIENTIFIC

4. ESECUZIONE DEL SAGGIO

4.1 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 (MAE per *Candida albicans*) e incubati a 37°C ± 1°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 conta da 1.5 x 10^6 a 5.0 x 10^6 ufc/ml (sospensione di prova).

4.2 Conta delle sospensioni di prova

Sono state effettuate diluizioni seriali in diluente fino a 10^{-5} - 10^{-6} delle sospensioni di prova aventi concentrazione da 1.5 x 10^6 a 5.0 x 10^6 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°C ± 1°C.

4.3 Rivestimenti degli impianti dentali

I rivestimenti sono stati realizzati con la seguente procedura:

1) lavaggio degli impianti con acqua distillata

2) rivestimento con PHMB al 10% in soluzione idroalcolica con tempi di immersione pari a 60 minuti e 120 minuti

3) lavaggio con etanolo

4) essiccamento in corrente d'aria.

4.4 Esecuzione del saggio

Per ogni ceppo dei microrganismi è stata allestita una provetta contenente 5 ml di sospensione di prova avente una concentrazione tra 1.5×10^6 e 5.0×10^6 ufc/ml. Successivamente, da ogni provetta è stato prelevato 1 ml e posto in un'unica provetta che contiene quindi, alla fine della procedura, una miscela di tutti i ceppi dei microrganismi aventi concentrazione compresa nell'intervallo $1.5 \times 10^6 - 5.0 \times 10^6$ ufc/ml.

Gli impianti dentali, trattati e non trattati, sono stati immersi nelle miscele di prova, contenenti le specie microbiche, ed estratti dopo 10 secondi. I

campioni sono stati lasciati sotto cappa sterile a contatto con l'aria per un tempo pari a 5 minuti. Al termine di questo tempo, gli impianti sono stati messi in piastre Petri e ricoperti con terreno di coltura liquido, mantenuto alla temperatura di 50°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 dei campioni e il terreno è stato poi lasciato solidificare. Le piastre Petri sono state infine poste in cella di incubazione a 37°C per 24 ore.

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

5. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

5.1 Calcolo delle unità vitali (ufc/ml) delle sospensioni di prova

Per il calcolo dei microrganismi presenti nelle sospensioni di prova è stata utilizzata la seguente equazione:

ufc/ml = C / (n x V x d)

C = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

n = numero delle piastre contate

V = volume usato

d = fattore di diluizione corrispondente alla diluizione effettuata.

Il conteggio è stato effettuato usando il numero delle colonie contate su entrambe le piastre.

RISULTATI

1. Saggio preliminare

Tabella II - Valori di concentrazione (ufc/ml) delle sospensioni di prova

MICROORGANISMI TEST	CONCENTRAZIONE DELLE SOSPENSIONI DI PROVA (ufc/ml)
Staphylococcus aureus (ATCC 6538)	$3.71x10^6$
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 15442)	$2.18x10^6$
Escherichia coli (ATCC 10536)	$1.94x10^6$
Enterococcus hirae (ATCC 10541)	$1.70x10^6$
Candida albicans (ATCC 10231)	$3.26x10^6$

1. Saggio vero e proprio

Le immagini in Figure 6A, 6B, 6C rappresentano lo sviluppo di piastre dove sono stati posti gli impianti dentali trattati con la procedura descritta e non

trattati dopo il contatto con la miscela di prova contenente le specie batteriche *S. aureus, E. coli, E. hirae, P. aeruginosa* e la specie fungina *C. albicans.*

Come evidenziato nelle immagini delle Figure 6A-6C, gli impianti dentali trattati con PHMB dimostrano una elevata attività antimicrobica, inducendo la totale mortalità delle cellule microbiche. L'attività è stata osservata inalterata per impianti immersi nella soluzione di PHMB per 120 o 60 minuti.

Gli impianti sono stati immersi in soluzioni di microrganismi estremamente concentrate (>10^6 ufc/ml) e pertanto la loro superficie è venuta a contatto con milioni di cellule microbiche. L'elevata attività antimicrobica è stata verificata per tutti i ceppi test considerati ed è stata confermata anche a distanza di 5 giorni dal trattamento iniziale.

Risulta evidente che la poliesametilen biguanide PHMB si adsorbe in modo stabile sulla superficie di impianti metallici costituiti da titanio e conferisce alla loro superficie una elevata proprietà microbicida, che si mantiene inalterata per diversi giorni dalla applicazione, pur mantenendo gli impianti esposti a contaminazioni derivanti dalle specie microbiche ambientali. In particolare, il tempo di rilascio di PHMB dalla superficie dell'impianto è maggiore di 5 giorni.

Oltre agli impianti dentali sopra descritti, ulteriori impianti che possono essere trattati secondo l'invenzione sono in generale le protesi ortopediche che richiedono un processo di osteointegrazione che eviti processi di rigetto dovuto ad infezioni microbiche.

RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo implantare in titanio o sue leghe comprendente sulla sua superficie un rivestimento di poliesametilen biguanide (PHMB).

2. Dispositivo implantare in titanio o sue leghe secondo la rivendicazione 1, in cui detto dispositivo è un impianto dentale.

3. Dispositivo implantare in titanio o sue leghe secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la poliesametilen biguanide è trattenuta in modo stabile sulla superficie dell'impianto, con un tempo di rilascio maggiore di 5 giorni.

4. Procedimento per la realizzazione del dispositivo implantare secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, comprendente le seguenti fasi:

a) mettere a disposizione un dispositivo implantare in titanio o sue leghe;

b) immergere il dispositivo implantare in una soluzione contenente PHMB per un tempo predeterminato;

c) opzionalmente, lavare la superficie trattata del dispositivo implantare;

d) essiccare la superficie del dispositivo implantare.

5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, in cui la soluzione della fase b) contenente PHMB è una soluzione idroalcolica.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui detta soluzione idroalcolica contiene alcool etilico in quantità compresa tra 20% e 60% v/v.

7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 6, in cui la soluzione di PHMB della fase b) contiene PHMB in una concentrazione compresa tra 2% e 10% in peso.

8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 7, in cui il tempo di permanenza del dispositivo implantare nella soluzione di PHMB della fase b) è compreso tra 10 e 300 minuti.

9. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 8, in cui la fase c) di lavaggio comprende il lavaggio con un alcol.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui detto alcol è alcool etilico.

11. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 10, in cui la fase d) di essiccamento è condotta mediante flusso d'aria a temperature comprese fra 20 e 60°C.

12. Dispositivo implantare in titanio o sue leghe comprendente sulla sua superficie un rivestimento di

poliesametilen biguanide (PHMB), come ottenibile secondo il procedimento delineato in una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 11.

CLAIMS

1. Implant device made of titanium or alloys thereof comprising on its surface a polyhexamethylene biguanide (PHMB) coating.

2. Implant device made of titanium or alloys thereof according to claim 1, wherein said device is a dental implant.

3. Implant device made of titanium or alloys thereof according to claim 1 or 2, wherein polyhexamethylene biguanide is firmly retained on the implant surface, with a release time longer than 5 days.

4. Method for making the implant device according to any one of claims 1 to 3, comprising the following steps:

a) providing an implant device made of titanium or alloys thereof;

b) immersing the implant device in a solution containing PHMB for a predetermined time;

c) optionally, washing the treated surface of the implant device;

d) drying the surface of the implant device.

5. Method according to claim 4, wherein the solution of step b) containing PHMB is a hydroalcoholic solution.

6. Method according to claim 5, wherein said hydroalcoholic solution contains ethyl alcohol in an amount ranging from 20% to 60% v/v.

7. Method according to any one of claims from 4 to 6, wherein the PHMB solution of step b) contains PHMB in a concentration ranging from 2% to 10% by weight.

8. Method according to any one of claims from 4 to 7, wherein the residence time of the implant device in the PHMB solution of step b) ranges from 10 to 300 minutes.

9. Method according to any one of claims from 4 to 8, wherein the washing step c) comprises washing using alcohol.

10. Method according to claim 9, wherein said alcohol is ethyl alcohol.

11. Method according to any one of claims 4 to 10, wherein the drying step d) is carried out through air flow at temperatures ranging from 20 to 60°C.

12. Implant device made of titanium or alloys thereof comprising on its surface a polyhexamethylene biguanide (PHMB) coating, as can be obtained according to the method set forth in any one of claims 4 to 11.

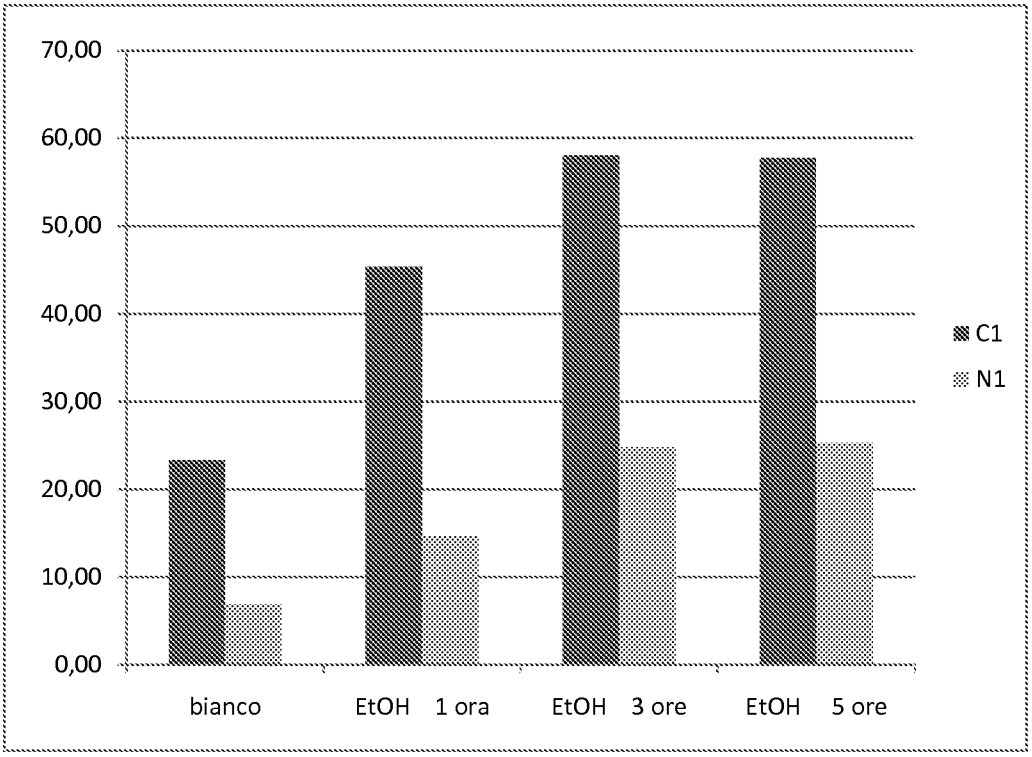


Figura 1

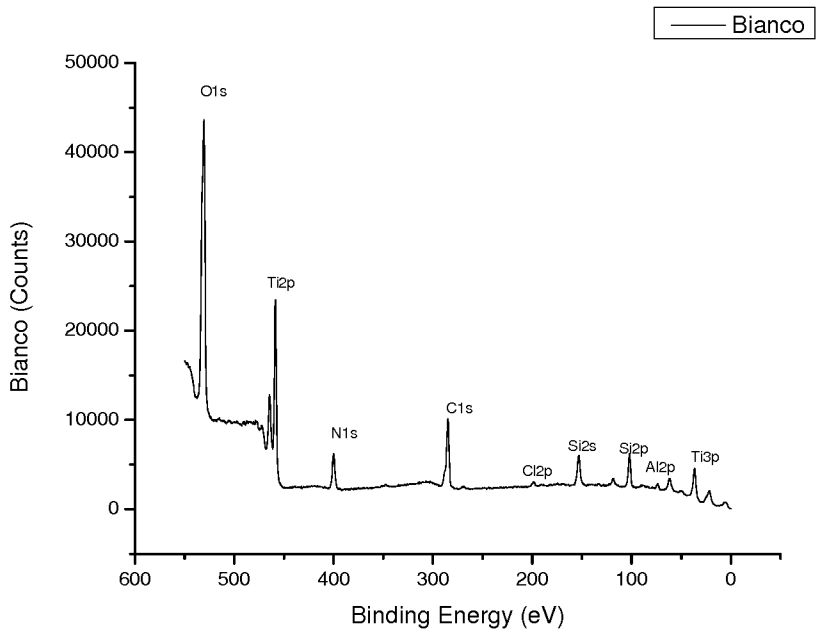


Figura 2

P.I.: DENTAL TECH S.R.L.

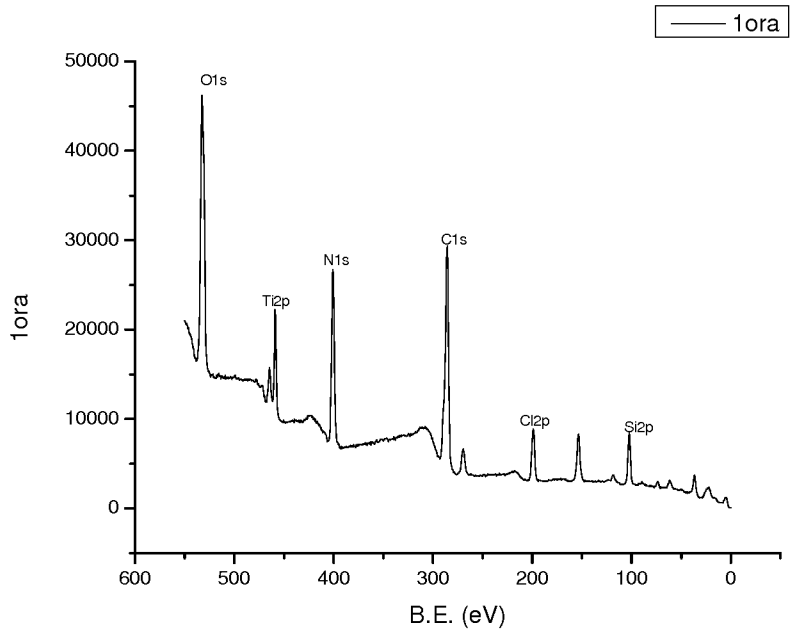


Figura 3

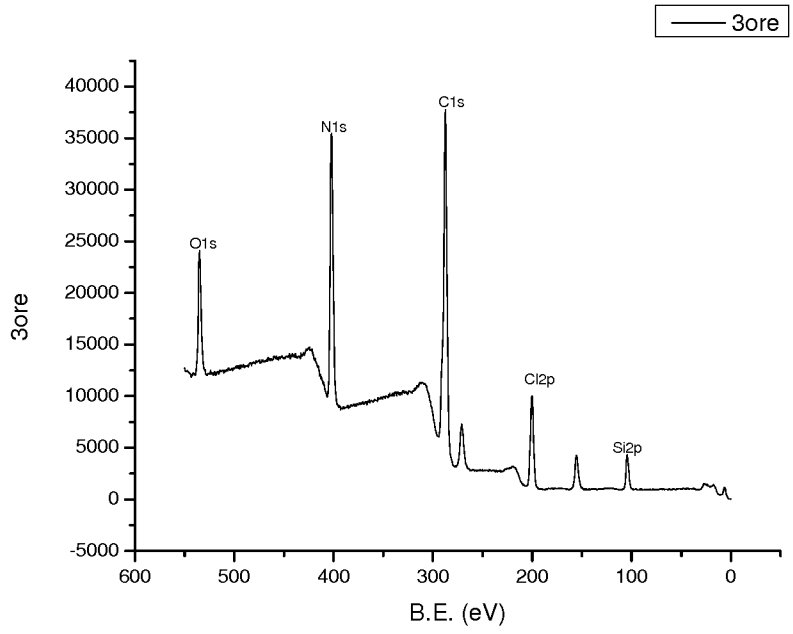


Figura 4

P.I.: DENTAL TECH S.R.L.

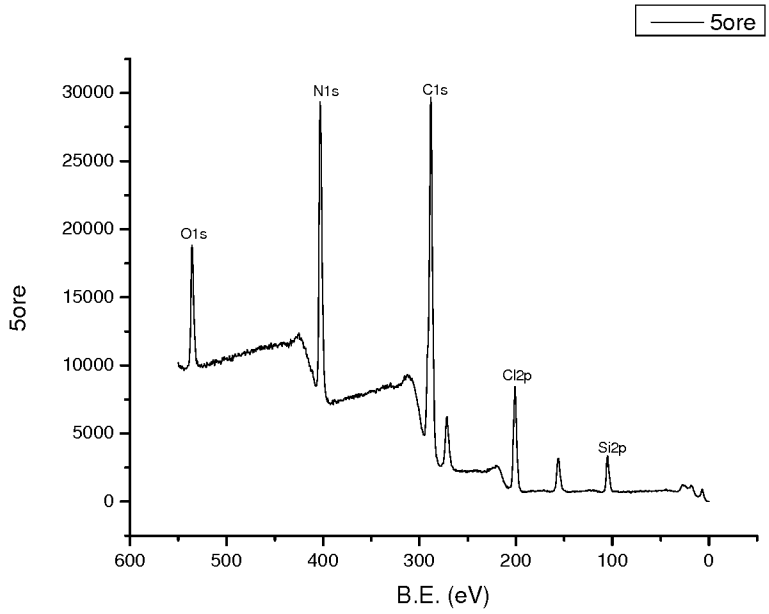
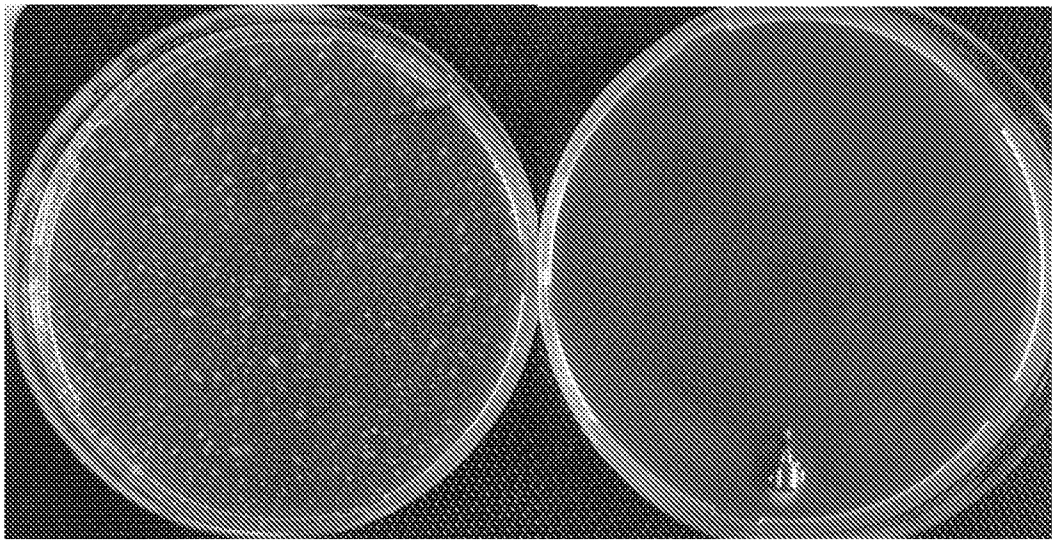


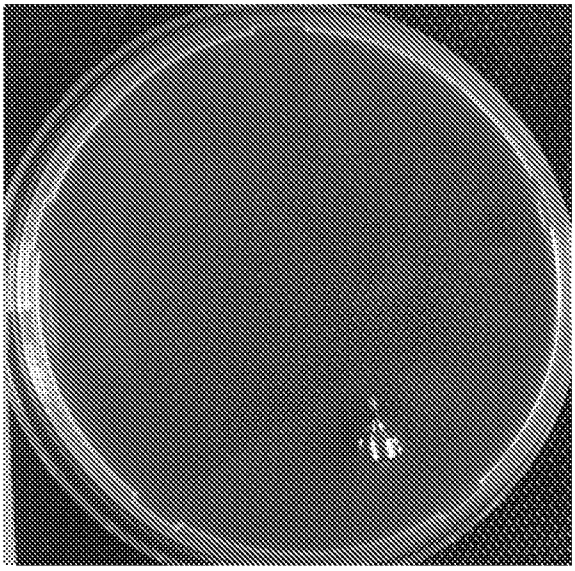
Figura 5



Controllo trattato: immersione 60 min.

Figura 6A Figura 6B

P.I.: DENTAL TECH S.R.L.



Trattato: immersione 120 min.

Figura 6C