



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0813639-4 A2



(22) Data do Depósito: 08/07/2008

(43) Data da Publicação Nacional: 29/09/2020

(54) Título: IMPLANTE DE TECIDO ÓSSEO COMPREENDENDO ÍONS DE LÍTIO.

(51) Int. Cl.: A61F 2/30; A61C 8/00; A61L 27/10; A61L 27/30.

(30) Prioridade Unionista: 09/07/2007 EP 07112079.4.

(71) Depositante(es): ASTRA TECH AB.

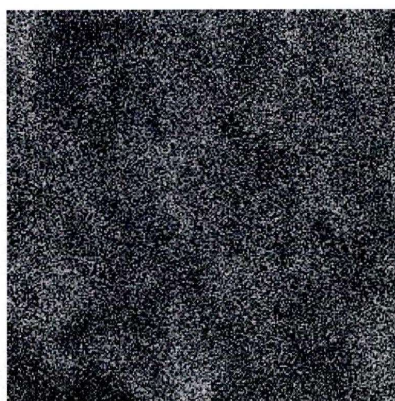
(72) Inventor(es): STIG HANSSON; INGELA PETERSSON.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008058858 de 08/07/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/007371 de 15/01/2009

(85) Data da Fase Nacional: 08/01/2010

(57) Resumo: IMPLANTE DE TECIDO ÓSSEO COMPREENDENDO ÍONS DE LÍTIO. A presente invenção refere-se à administração local de íons de lítio no tecido ósseo que foi constatada melhorar a formação óssea e massa óssea na implantação de um implante de tecido ósseo no referido tecido ósseo. Em particular, a invenção refere-se a um implante de tecido ósseo tendo uma superfície de implante revestida por uma camada de óxido que compreende íons de lítio e um método para a manufatura do mesmo. Um pé explosivo compreendendo íons de lítio, um método para localmente aumentar a formação óssea, e o uso de íons de lítio ou um sal é fornecido para fabricar uma composição farmacêutica para localmente aumentar a formação óssea são da mesma forma fornecidos pela presente invenção.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"IMPLANTE DE TECIDO ÓSSEO COMPREENDENDO ÍONS DE LÍTIO"**.

Campo técnico

A presente invenção refere-se a um implante para implantação
5 no tecido ósseo e um método para fabricação do mesmo.

A invenção da mesma forma refere-se a um pó explosivo e um método para localmente aumentar a formação óssea.

Antecedentes da técnica

Um procedimento de um estágio é usado hoje em dia frequen-
10 temente para implantar implantes ortopédicos ou dentais, implantes geral-
mente metálicos, no tecido ósseo.

No procedimento de um estágio, uma primeira parte do implante,
como uma fixação dentária, é cirurgicamente colocada no tecido ósseo, e
um tampão de cicatrização ou uma parte do implante secundária, tal como
15 um reforço, é em seguida fixado à primeira parte do implante diretamente
após a operação cirúrgica. O tecido macio é depois disso permitido cicatrizar
ao redor do tampão de cicatrização ou a parte do implante secundário.
Quando um tampão de cicatrização é usado, o tampão é removido depois de
algumas semanas ou meses sem qualquer procedimento cirúrgico, e partes
20 de implante secundárias, tal como um reforço e uma coroa provisória, são
fixados à primeira parte do implante. O procedimento de um estágio é descri-
to por exemplo em L Cooper e outros: "A multicenter 12-month evaluation of
single-tooth implants restored 3 weeks after 1-stage surgery", The Internatio-
nal Journal of Oral & Maxillofacial Implants, Vol 16, No 2 (2001).

25 O procedimento de dois estágios, que é outro procedimento de
implantação conhecido, envolve em um primeiro estágio colocar cirurgica-
mente uma primeira parte do implante, tal como uma fixação dentária, no
tecido ósseo, onde é em seguida permitida descansar descarregada e imó-
vel durante um período de cicatrização de três meses ou mais para permitir
30 o tecido ósseo crescer sobre a superfície do implante para permitir o implan-
te ser bem fixado ao tecido ósseo, o corte no tecido macio que reveste o lo-
cal do implante que é permitido cicatrizar sobre o implante, e em um segun-

do estágio abrir o tecido macio que reveste o implante e fixar partes de implante secundárias, tal como um reforço dentário e/ou um dente de restauração, à primeira parte do implante, tal como a referida fixação, formando a estrutura de implante final. Este procedimento é descrito por exemplo por
5 Branemark e outros: "Osseointegrated Implants in the Treatment of the Edentulous Jaw, Experience from a 10-year period", Almquist & Wiksell International, Stockholm, Sweden.

Entretanto, o fato de que o implante não deve ser carregado durante o período de cicatrização significa que as partes de implante secundárias podem não ser fixadas à primeira parte do implante e/ou usadas durante
10 o período de cicatrização de três meses ou mais. Devido ao desconforto associado com este, é desejável minimizar o período de tempo necessário para o primeiro estágio supracitado ou até mesmo realizar o procedimento de implantação inteiro em uma única operação, isto é, usar o procedimento de
15 um estágio.

Para alguns pacientes, pode ser considerado melhor esperar pelo menos três meses antes de funcionalmente carregar o implante, ambos para procedimentos de um e dois estágios. Entretanto, uma alternativa usando o procedimento de um estágio é pôr o implante diretamente na função
20 depois da implantação (carregamento imediato) ou algumas semanas depois da implantação (carregamento inicial). Estes procedimentos são, por exemplo, descritos por D M Esposito, pp 836-837, in Titanium in Medicine, Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Application, Sphnger-Verlag (2001).

É essencial que o implante estabeleça uma estabilidade suficiente e uma ligação entre o implante e o tecido ósseo para permitir o carregamento imediato ou inicial descrito acima do implante. Será da mesma forma notado que um carregamento imediato ou inicial do implante pode ser benéfico para a formação do osso.
25

Alguns dos metais ou ligas, tal como titânio, zircônio, háfnio, tântalo, nióbio, ou ligas dos mesmos que são usados para implantes de osso são capazes de formar uma ligação relativamente forte com o tecido ósseo,
30

uma ligação que pode ser tão forte quanto o tecido ósseo por si próprio, às vezes até mais forte. O exemplo mais notável deste tipo de material de implante metálico é o titânio e ligas de titânio cujas propriedades neste respeito foram conhecidas desde aproximadamente 1950. Esta ligação entre o metal e o tecido ósseo foi chamada "osseointegração" (Albrektsson T, Branemark P I, Hansson H A, Lindström J, "Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone anchorage in man", Acta Orthop Scand, 52:155-170 (1981)).

Pode ser notado que em contato com o oxigênio, titânio, zircônio, háfnio, tântalo, nióbio e suas ligas são instantaneamente revestidas com uma camada de óxido fina. Esta camada de óxido nativa em implantes de titânio principalmente consiste em dióxido de titânio(IV) (TiO_2) com quantidades menores de Ti_2O_3 , TiO e Ti_3O_4 .

Embora a ligação entre o metal (oxidado), por exemplo titânio, e o tecido ósseo possa ser comparativamente forte, é desejável realçar esta ligação.

Há até hoje vários métodos para tratar implantes metálicos para obter uma melhor fixação do implante, e desse modo osseointegração melhorada. Alguns destes envolvem alterar a morfologia do implante, por exemplo criando-se irregularidades na superfície do implante para aumentar a aspereza da superfície em comparação a uma superfície não-tratada. Acredita-se que uma aspereza de superfície aumentada, que proporciona uma área de fixação e contato maior entre o implante e o tecido ósseo fornece uma resistência e retenção mecânica melhores entre o implante e o osso. É bem-conhecido dentro da técnica que uma aspereza de superfície pode ser fornecida, por exemplo, por vaporização de plasma, jateamento ou cauterização ácida.

Outros métodos para obter uma melhor fixação do implante ao tecido ósseo envolvem a alteração das propriedades químicas da superfície do implante.

Vários métodos envolvem a aplicação de uma camada de material cerâmico, tal como hidroxiapatita, à superfície do implante, interalia para

melhorar a ligação do implante ao osso desde que a hidroxiapatita seja quimicamente relacionada ao osso. Uma desvantagem com revestimentos que compreendem hidroxiapatita é, entretanto, que eles podem ser frágeis e podem descamar ou romper da superfície do implante, que pode por sua vez
5 levar a uma última perda do implante.

Outros métodos para alterar as propriedades químicas do implante envolvem a aplicação de flúor e/ou fluoreto na superfície do implante (WO 94/13334, WO 95/17217, WO 04/008983, e WO 04/008984).

WO 2006/004297 descreve um implante de metal osseointegrador,
10 tal como titânio ou uma liga do mesmo, compreendendo uma camada de óxido de metal e uma camada de um material bioativo composta de qualquer um ou mais dentre Li, Na, K, Rb, Cs, Fr, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra, Sc, Y, Lu, Ti, Zr, Hf, Nb, Ta, Cr, Mo, W, Mn, Re, Fe, Ru, Os, Co, Rh, Ir, Ni, Pd, Pt, Cu, Ag, Au, Zn, Ga, In, Sn e Bi formados nele. Um exemplo de funcionamento é,
15 entretanto, descrito apenas para um implante de titânio que compreende cálcio como a camada bioativa.

Menção pode da mesma forma ser feita de WO 2002/096475 referindo-se a um implante de titânio que compreende cálcio, fósforo ou enxofre na camada de óxido de titânio, e WO 2005/084577 referindo-se a um
20 implante de titânio compreendendo magnésio na camada de óxido de titânio.

Embora os implantes que fornecem uma ligação comparativamente forte entre a superfície do implante e o osso existam, há uma necessidade na técnica de realçar
esta ligação, isto é, melhorar o processo de "osseointegração" de um im-
25 plante no tecido ósseo.

Desse modo, há uma necessidade na técnica de fornecer um implante que tem uma taxa desejada de fixação e que tem a capacidade de formar uma ligação mecanicamente forte entre o osso e o implante na im-
plantação do mesmo no tecido ósseo.

30 **Sumário da invenção**

É um objetivo da invenção satisfazer as necessidades supracitadas.

Desse modo, um implante biocompatível pretendido para a implantação no tecido ósseo deve ser fornecido.

Os inventores constataram que íons de lítio localmente administrados no tecido ósseo tem um efeito local na formação óssea e massa óssea no tecido ósseo.

Foi também constatado que um implante que compreende uma camada de óxido na superfície compreendendo e/ou liberando íons de lítio induz uma produção aumentada de fosfatase alcalina em osteoblastos, que é crucial para outra diferenciação e mineralização. Conseqüentemente, uma taxa melhorada da formação óssea e uma taxa melhorada de fixação entre o tecido ósseo e o implante podem ser alcançadas, melhorando também a possibilidade de carregamento imediato ou inicial do implante.

Além disso, foi constatado que um implante que compreende uma camada de óxido na superfície compreendendo e/ou liberando íons de lítio fornece uma proliferação aumentada de osteoblastos e uma produção aumentada de osteoprotegerina, em comparação a um implante metálico que compreende uma camada de óxido na superfície contendo, por exemplo, íons de cálcio ou magnésio. Uma massa óssea melhorada é desse modo fornecida, a qual envolve uma ligação mecanicamente mais forte entre o implante e o tecido ósseo.

Conseqüentemente, foi constatado que íons de lítio localmente administrados melhoram o processo de osseointegração de um implante no tecido ósseo.

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, os objetivos precedentes são alcançados com um implante para implantação no tecido ósseo que tem uma superfície revestida por uma camada de óxido, em que a referida camada de óxido compreende íons de lítio.

De acordo com um segundo aspecto da invenção, um método para fabricar um implante de tecido ósseo tendo as características supracitadas é fornecido. O método compreende as etapas de:

- a) fornecer um implante que tem uma superfície de implante;
- b) formar uma camada de óxido que reveste a referida superfície de implante.

te;

c) formar íons negativamente carregados na referida camada de óxido; e

d) trazer a referida camada de óxido em contato com íons de lítio.

O método da invenção é econômico e fácil de realizar, desse modo permitindo a produção em massa. Além disso, é fácil esterilizar e armazenar.

De acordo com um terceiro aspecto da presente invenção, um pó explosivo compreendendo um óxido de metal que compreende íons de lítio é fornecido.

De acordo com um quarto aspecto da invenção, um método para localmente aumentar a formação óssea é fornecido. O referido método compreende administrar uma composição que compreende íons de lítio ou um sal dos mesmos e um veículo farmacologicamente aceitável para uma pessoa em necessidade do mesmo.

Um quinto aspecto da invenção refere-se ao uso de íons de lítio ou a um sal dos mesmos para fabricar uma composição farmacêutica para localmente aumentar a formação óssea.

Um sexto aspecto da invenção refere-se a um *kit* para implantação de um implante no tecido ósseo que compreende um implante e uma composição que compreende íons de lítio ou um sal dos mesmos e um veículo farmacologicamente aceitável.

Outras características e vantagens da presente invenção ficarão evidentes a partir da seguinte descrição da invenção.

Breve descrição dos desenhos

A figura 1 é uma imagem de TOF-SIMS que ilustra a presença e a distribuição de lítio para uma amostra de titânio esterilizada depois da redução em LiNO_3 . (Lítio é mostrado como pontos brancos).

A figura 2 ilustra a presença de lítio, (pico no 7) em uma amostra de titânio esterilizada (figura 2a) comparada à amostra de referência de uma amostra de titânio esterilizada com tratada com ácido oxálico (figura 2b) (de medidas de TOF-SIMS).

A figura 3 é uma imagem de TOF-SIMS que ilustra a presença e

a distribuição de lítio para uma amostra de titânio esterilizada depois da anodização em LiOH.

5 A figura 4 ilustra o grau de proliferação de células MG-63 depois da cultura de 3, 7 e 14 dias em poliestireno tratado por célula com e sem lítio em concentrações diferentes.

A figura 5 ilustra a produção de fosfatase alcalina no meio de cultura celular depois da cultura de 3, 7 e 14 dias em poliestireno tratado por célula com e sem lítio em concentrações diferentes.

10 A figura 6 mostra o grau de proliferação de células MG-63 em superfícies de referência 1 e 2 depois de 7 dias de cultura com e sem lítio em concentrações diferentes.

A figura 7 mostra a produção de fosfatase alcalina na superfície de referência 1 compreendendo lítio em uma concentração de 1 mM comparada à superfície não-estimulada que não compreende nenhum lítio.

15 A figura 8 é uma imagem de microscopia de elétron de varredura que ilustra a morfologia de células MG-63 cultivadas em superfície de referência 1 depois de 36h.

20 A figura 9 é uma imagem de microscopia de elétron de varredura que ilustra a morfologia de células MG-63 cultivadas em superfície de referência 2 depois de 36h.

A figura 10 é uma imagem de microscopia de elétron de varredura que ilustra a morfologia de células MG-63 cultivadas em superfície de referência 1 compreendendo lítio depois de 36h.

25 A figura 11 ilustra as diferenças na proliferação de célula MG-63 entre a superfície de referência 1, superfície de referência 2, e superfície de referência 1 compreendendo lítio, cálcio e magnésio, respectivamente.

A figura 12 mostra a quantidade de osteoprotegerina medida depois de 7 e 14 dias de cultura celular à superfície de referência 1 compreendendo lítio, cálcio, e magnésio, respectivamente.

30 A figura 13 ilustra os valores do teste de torque de remoção (RTQ) depois de 6 semanas de implantação na tíbia de coelho de um implante que compreende lítio de acordo com a invenção comparado a um im-

plante com uma superfície Osseospeed™ comercialmente disponível.

Descrição detalhada da invenção

5 Como usado aqui o termo "implante" inclui dentro de seu escopo qualquer dispositivo destinado a ser implantado no corpo de um animal vertebrado, em particular um mamífero, tal como um ser humano. Implantes podem ser usados para substituir a anatomia e/ou restabelecer qualquer função do corpo.

10 Geralmente, um implante é composto de uma ou várias partes de implante. Por exemplo, um implante dentário normalmente compreende uma fixação dentária acoplada às partes de implante secundárias, tal como um reforço e/ou um dente restaurado. Entretanto, qualquer dispositivo, tal como uma fixação dentária, destinada para implantação pode ser apenas referida como um implante se outras partes forem conectadas a este.

15 Como usado aqui, o termo "implante (destinado) para implantação no tecido ósseo" refere-se a implantes destinados pelo menos à implantação parcial no tecido ósseo, como implantes dentais, por exemplo, implantes de uma peça, implantes ortopédicos, e similares. Um implante para implantação no tecido ósseo pode da mesma forma ser referido como um implante de tecido ósseo.

20 Como usado aqui, o termo "superfície de implante" refere-se a pelo menos uma região de superfície definida de um implante. Desse modo, a região de superfície definida pode incluir a área de superfície inteira do implante ou porções da mesma.

25 Um exemplo de uma superfície de implante destinada para implantação no tecido ósseo é a superfície de uma fixação dentária que é destinada para implantação no osso maxilar de um paciente e para entrar em contato com tecido ósseo.

30 Outro exemplo de uma superfície de implante destinada para implantação no tecido ósseo é a superfície de um implante de quadril que é destinado para implantação no fêmur de um paciente.

A presente invenção refere-se a um implante para implantação no tecido ósseo que tem uma superfície; a referida superfície sendo revesti-

da por uma camada de óxido, em que a referida camada de óxido compreende íons de lítio.

Um implante de acordo com a invenção é biocompatível e tem um efeito local sobre a formação óssea e massa óssea no tecido ósseo. Além disso, o implante inventivo causa uma proliferação aumentada de osteoblastos, e uma produção aumentada de fosfatase alcalina e osteoprotegerina no tecido ósseo. Fosfatase alcalina é uma enzima produzida por osteoblastos que desempenha um papel principal na mineralização do osso, e a osteoprotegerina é uma citocina conhecida por aumentar a densidade mineral do osso e volume do osso no tecido ósseo. A produção de fosfatase alcalina e osteoprotegerina indica claramente que o implante de acordo com a invenção tem um efeito positivo na remodelagem do osso.

Um implante de acordo com a invenção fornece uma estabilidade de implante melhorada e resposta de tecido ósseo quando medida por teste de torque de remoção (RTQ) (figura 13).

A camada de óxido que reveste a superfície de implante compreende íons de lítio que são espalhados em pelo menos parte da camada de óxido.

Lítio é um íon de peso leve, não tóxico, positivamente carregado, pequeno que foi constatado ser disperso facilmente na camada de óxido que reveste a superfície do implante.

Embora um efeito terapêutico de sais de lítio seja conhecido para distúrbios maníaco-depressivos, estudos mostram que a terapia de lítio da mesma forma afeta o metabolismo mineral do osso (por exemplo, Baran e outros, "Lithium Inhibition of Bone Mineralization and Osteoid Formation", *J Clin Invest*, pp 1691 -1696 (1978); Nordenström e outros, "Biochemical Hyperparathyroidism and Bone Mineral Status in Patients Treated Long-Term with Lithium", *Metabolism*, vol 43, No 12, pp 1563-1567 (1994); e Mak e outros, "Effects of Lithium Therapy on Bone Mineral Metabolism: A Two-Year Prospective Longitudinal Study", *J Clin Endocrin and Metabol*, vol 83, No 11, pp 3857-3859 (1998)).

Recentemente, a administração oral de cloreto de lítio foi sugerida

da para o tratamento de distúrbios de massa óssea baixa, tal como osteoporose, visto que foi concluído que o lítio realça a formação óssea e melhora a massa óssea por ativação da série de reação de Wnt canônica que resulta em, por exemplo, a estimulação da replicação de preosteoblasto, indução de osteoblastogênese e inibição e apoptose de de osteoblasto e osteócito (Clement-Lacroix e outros, "Lrp5- independent Activation of Wnt Signalling by Lithium Chloride Increases Bone Formation and Bone Mass in Mice", PNAS, vol 102, Nº 48, pp 17406-17411 (2005) e Krishnan e outros, "Regulation of Bone Mass by Wnt Signaling", J Clin Invest, vol 116, No 5, pp 1202-1209 (2006).

As séries de reações de sinalização de Wnt é um alvo atrativo para o tratamento de osteoporose, e em geral para descoberta de fármaco anabólico ósseo (Rawadi G e outros, "Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis", Expert. Opin. Ther. Targets, Vol 9, pp 1063-1077 (2005))). O fato que o lítio ativa a série de reação de Wnt torna a presente invenção altamente adequada para implantação no tecido ósseo.

Além disso, o fato que o lítio foi previamente usado para o tratamento de transtornos maníacos-depressivos subentende-se que o quadro toxicológico e os efeitos colaterais na administração sistêmica são bem conhecidos.

Além disso, lítio tem uma química relativamente simples e é geralmente indestrutível e não afetado, por exemplo, por esterilização.

A incorporação de íons de lítio na camada de óxido pode romper a estrutura de óxido, desse modo tornando o óxido mais reativo. Quando a camada de óxido estiver incorporada com íons de lítio positivamente carregados, uma densidade de custo de superfície positiva aumentada é fornecida na superfície de óxido (superfície do implante). Consequentemente, as proteínas ricas em elétron no tecido ósseo pode ser eletricamente atraída à superfície. Íons incorporados podem da mesma forma afetar a condutividade do óxido que pode ter um efeito positivo sobre a osseointegração e hemo-compatibilidade.

Pelo menos parte da camada de óxido deve compreender íons

de lítio, e o efeito osseoindutor desejado de lítio em um implante da invenção pode ser alcançado pela presença dos íons na camada de óxido. Entretanto, pode da mesma forma ser alcançado pela liberação de íons de lítio da camada de óxido no fluido fisiológico que cerca o implante.

5 Preferivelmente, íons de lítio são homoganeamente distribuídos na camada de óxido. Tal distribuição homogênea é ilustrada na figura 1.

O implante de acordo com a presente invenção é adequadamente um implante metálico, tal como um implante feito de titânio ou uma liga de titânio.

10 Em modalidades, entretanto, o implante pode ser um implante não-metálico que compreende por exemplo uma cerâmica, um plástico ou um material de composto. Em tais modalidades, a superfície de implante é uma camada de implante metálica aplicada no implante não-metálico, por meio do qual uma superfície de implante na parte metálica é fornecida. A
15 camada de implante metálica preferivelmente compreende titânio ou uma liga de titânio.

Entretanto, o implante metálico, e a camada de implante metálico não são limitados a um metal específico, mas podem ser feitos de qualquer material metálico biocompatível, tal como zircônio ou uma liga do mesmo, háfnio ou uma liga do mesmo, nióbio ou uma liga do mesmo, tântalo ou
20 uma liga do mesmo, uma liga de cromo-vanádio, ou qualquer combinação destes materiais.

A camada de óxido que reveste a superfície do implante tem uma espessura dentro da faixa de de 2 a 100 nm.

25 Em contato com oxigênio, titânio, zircônio, háfnio, tântalo, nióbio e suas ligas são instantaneamente revestidos com uma fina camada de óxido. Esta camada de óxido nativa em implantes de titânio consiste principalmente em dióxido de titânio (IV) (TiO_2) com quantidades menores de Ti_2O_3 , TiO e Ti_3O_4 .

30 Em modalidades preferidas, a camada de óxido é uma camada de óxido que é formada espontaneamente, por exemplo, em contato com o ar. A espessura de uma tal camada de óxido espontaneamente formada está

dentro da faixa de 2 a 18 nm, por exemplo, dentro da faixa de 2 a 6 nm.

A camada de óxido de acordo com a invenção não cresce substancialmente mais espessa com o passar do tempo e protege a superfície metálica subjacente de reagir com qualquer agente circundante.

5 Superfícies de implantes de metal revestidas por camadas de óxido são conhecidas na técnica. Entretanto, vários documentos da técnica anterior realçam a importância de fornecer uma camada de óxido espessa, preferivelmente acima de 600 nm sobre a superfície de implante (Sul e outros, "Resonance frequency and removal torque analysis of implants with
10 turned and anodized surface oxides", Clin. Oral. Impl. Res., Vol 13, pp 252-259 (2002); Sul e outros, "Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants", Biomaterials, Vol 23, No 8, pp 1809-1817 (2002)). Tais implantes requerem uma etapa adicional de oxidação visto que as camadas de óxido da espessura supracitada não são espontaneamente alcançáveis.
15

Os presentes inventores constataram que uma camada de óxido que tem uma espessura menor que 100 nm, preferivelmente uma camada de óxido que tem a densidade de uma camada de óxido nativa, isto é, uma camada de óxido espontaneamente formada, menor que 18 nm é mais adequada para implantação no tecido ósseo visto que as camadas de óxido espessas possam ser muito frágeis. Além disso, as camadas de óxido espessas podem levar à fratura e descascamento durante períodos mais longos de implantação de um implante no tecido ósseo.
20

Esta descoberta está em contraste com Xiropaidis e outros que relata que implantes de titânio com camadas de óxido nativas são considerados menos osteocondutivos. (Xiropaidis e outros, "Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite®)-modified oral implants", Clin. Oral. Impl. Res, No 16, pp 532-539 (2005)).
25

Uma camada de óxido de acordo com a invenção não interfere com, ou modifica a topografia da superfície de implante. Além disso, um implante que compreende uma camada de óxido que tem uma espessura menor que 100 nm, por exemplo menor que 18 nm, por exemplo, entre 2 e 6 nm
30

é biocompatível tornando adequado para incorporação no corpo humano.

Consequentemente, uma camada de óxido que compreende íons de lítio de acordo com a invenção é adequada para qualquer geometria ou qualquer substrato.

5 A superfície do implante de acordo com a invenção é preferivelmente uma superfície de implante metálico que compreende uma camada de óxido de metal em sua superfície.

Em particular, o implante, em particular a superfície do implante de acordo com a invenção compreende titânio ou uma liga do mesmo. Uma tal superfície do implante é desse modo revestida por uma camada de óxido de titânio.

Consequentemente, em um implante da presente invenção, a camada de óxido que reveste a superfície do implante é uma camada de óxido de metal formada na superfície metálica do implante.

15 Em modalidades, o implante de acordo com a invenção pode também ser fornecido com um depósito no topo da camada de óxido. Um tal depósito pode compreender um agente estimulador de osso, tal como lítio, estrôncio, cálcio, magnésio ou qualquer outro íon que têm um efeito estimulador de osso. Tipicamente, o depósito compreende íons de lítio.

20 Como usado aqui, o termo "depósito" refere-se a uma película contínua ou descontínua fornecida no topo da camada de óxido. Um tal depósito pode ter qualquer espessura e não está incorporado na camada de óxido, porém, é fornecido nele.

Tipicamente, o depósito é uma precipitação de sal compreendendo qualquer uma ou uma combinação de íons selecionada de lítio, estrôncio, magnésio e cálcio.

Usualmente, o depósito é uma precipitação de sal de lítio, isto é, um sal de lítio que é precipitado sobre o topo da camada de óxido da superfície de implante.

30 Exemplos de sais de lítio adequados são hidróxido de lítio, fluoreto de lítio, cloreto de lítio, sulfato de lítio, nitrato de lítio, carbonato de lítio. Entretanto, qualquer sal de lítio capaz de ser pelo menos parcialmente dis-

solvido no fluido fisiológico que cerca o implante pode ser usado. Tais sais são conhecidos por uma pessoa versada na técnica.

Na implantação, um depósito compreendendo uma precipitação de sal dissolve facilmente e rapidamente no fluido circundante tal que os íons estimuladores de osso são liberados do implante. Um implante fornecido com um tal depósito em sua superfície pode ser particularmente benéfico em situações onde um implante necessita integrar-se mais rapidamente, por exemplo, no osso de quantidade e qualidade inferior.

Uma vantagem associada com um implante compreendendo um depósito do tipo mencionado acima em sua superfície é que íons estimuladores de osso, por exemplo íons de lítio são facilmente e eficientemente liberados no fluido fisiológico que cerca o implante. Conseqüentemente, uma dose mais alta de íons estimuladores de osso, por exemplo, íons de lítio podem ser liberados no fluido circundante.

Dessa maneira, o efeito desejado de lítio pode ser obtido igualmente de íons presentes no óxido na camada de óxido na superfície de implante e íons liberados deste.

Um implante de acordo com a presente invenção adequadamente necessita de um revestimento compreendendo um composto de fosfato de cálcio. Como esboçado na introdução, tais implantes são mais propensos a formar flocos ou romper da superfície do implante, que pode levar a uma perda do implante.

Em modalidades da invenção, a superfície de implante pode adicionalmente compreender uma microaspereza tendo uma aspereza de raiz quadrada média (R_q e/ou S_q) de ≤ 250 nm (isto é, uma microaspereza compreendendo poros tendo um diâmetro de poro de ≤ 1 μ m e uma profundidade de poro de ≤ 500 nm) em pelo menos uma parte da superfície de implante. Como usado aqui, o termo "nano- ou microaspereza" refere-se a uma aspereza de superfície compreendendo irregularidades de superfície tendo dimensões menores do que 1 μ m.

Tal aspereza de superfície é provável produzir um contato maior e área de ligação entre o implante e o tecido ósseo, e fornece uma melhor

retenção mecânica e resistência entre implante e osso. Em modalidades alternativas, a superfície de implante compreende flúor e/ou fluoreto, como 0,2-20 a %, e opcionalmente da mesma forma uma microaspereza tendo uma aspereza de raiz quadrada média (R_q e/ou S_q) de ≤ 250 nm, em pelo menos uma parte da superfície de implante.

Opcionalmente, a superfície do implante de acordo com a invenção pode compreender uma macroaspereza. Quando usado aqui o termo "macroaspereza" refere-se a uma aspereza de superfície compreendendo irregularidades de superfície tendo dimensões maiores do que $1 \mu\text{m}$.

Será da mesma forma notado que a superfície de implante pode ser enroscada ou desenroscada ou pode ser dado outras características topográficas dependentes de uso.

Além disso, a presente invenção refere-se a um método para fabricar um implante de tecido ósseo tendo as características esboçadas acima, compreendendo as etapas de:

- a) fornecer um implante tendo uma superfície de implante;
- b) formar uma camada de óxido revestindo a referida superfície de implante;
- c) formar íons negativamente carregados na referida camada de óxido; e
- d) trazer a referida camada de óxido em contato com íons de lítio.

Como previamente mencionado, o implante pode ser um implante metálico, ou pode ser um implante não-metálico fornecido com uma superfície metálica. Quando implantes não-metálicos são usados na presente invenção, uma superfície de implante metálica pode ser fornecida por qualquer técnica adequada conhecida por aqueles versados na técnica. Por exemplo, qualquer tratamento eletroquímico adequado pode ser usado.

Uma camada de óxido revestindo a superfície do implante é preferivelmente formada espontaneamente, por exemplo em contato com ar. Uma tal camada é passiva e inerte, isto é, é estável e previne a superfície metálica subjacente de outra reação.

É, entretanto, possível usar qualquer técnica de oxidação convencional no método acima. Consequentemente, o método não está limitado à formação espontânea de uma camada de óxido. Por exemplo, uma cama-

da de óxido pode ser formada em uma superfície de implante metálica por oxidação anódica do implante em um eletrólito, tal como uma solução aquosa de um ácido orgânico. Uma camada de óxido pode da mesma forma ser formada em uma superfície de implante metálica aquecendo-se em ar a, por exemplo, 150 - 1300°C. Além disso, uma camada de óxido pode ser formada em uma superfície de implante metálica precipitando o óxido na superfície de implante de uma solução adequada.

Como já mencionado, uma camada de óxido revestido na referida superfície de implante é preferivelmente formada espontaneamente, que é vantajoso como nenhuma etapa adicional de oxidação é atualmente requerida.

Referindo-se à etapa c) no método esboçado acima, íons negativamente carregados podem ser formados na referida camada de óxido submetendo-se à superfície de implante a um ambiente alcalino.

Em contato com uma solução aquosa, o óxido de metal, por exemplo, superfície de óxido de titânio romperá a estrutura de molécula de água em seus arredores próximos, e, dependendo do pH, torna-se positivamente ou negativamente carregado. Quando a superfície é não carregada e nenhum íon é absorvido na superfície, o pH é chamado o ponto de carga zero pH_{PZC} . O pH_{PZC} para óxido de titânio está entre 5-7.

Consequentemente, quando a superfície de óxido de titânio é circundada por um ambiente aquoso, alcalino, por exemplo uma solução alcalina tendo um pH acima de 7, a superfície torna-se levemente negativamente carregada devido à formação de ligação de superfície, grupos hidróxido negativamente carregados. Íons de lítio positivamente carregados, que podem estar presentes em uma solução circundante podem, desse modo, ser eletricamente atraídos à superfície de óxido (superfície de implante) e desse modo torna-se incorporado em pelo menos parte da camada de óxido, tipicamente na parte superior da camada de óxido. Preferivelmente, os íons de lítio são homoganeamente distribuídos na camada de óxido.

Um ambiente alcalino pode ser obtido localmente na superfície do óxido; isto é íons negativamente carregados podem ser formados na ca-

mada de óxido aplicando-se um potencial que é mais negativo do que -0,5 V; tipicamente na faixa de -0,5 a -3,5 V. A aplicação de um tal potencial aumentará o rompimento de moléculas de água, gerando a formação de gás hidrogênio, e ligação de superfície, grupos hidróxido negativamente carregados na superfície de implante.

Alternativamente, um ambiente alcalino é obtido submetendo-se a superfície de implante a uma solução alcalina, por exemplo, embebendo-se a superfície de implante em uma solução alcalina. Uma tal solução alcalina deveria ter um pH mais alto do que 7, por exemplo mais alto do que 10; e tipicamente mais alto do que 11. O tempo de saturação pode ser menos do que 30 minutos, por exemplo menos do que 20 minutos, tipicamente entre 10 e 15 minutos.

A superfície de implante é em seguida trazida em contato com íons de lítio positivamente carregados; por exemplo submetendo-se à superfície de implante a uma solução compreendendo íons de lítio. A etapa de trazer a referida camada de óxido em contato com íons de lítio pode ser realizada simultaneamente com ou depois da etapa de formar íons negativamente carregados na referida camada de óxido. Preferivelmente as etapas c) e d) do método de acordo com a invenção são realizadas simultaneamente.

Por exemplo, aplicando-se um potencial dentro da faixa dentre -0,5 V a -3,5 V em uma solução compreendendo lítio, grupos hidróxido negativamente carregados serão formados, levando a uma interação eletrostática entre grupos hidróxido de ligação de superfície e íons de lítio presentes na solução. Esta interação eletrostática resulta em que íons de lítio estão incorporados na camada de óxido. Isto é também descrito no exemplo 1.

A solução compreendendo íons de lítio pode ser uma solução compreendendo hidróxido de lítio em uma concentração de 5,3 M ou menos. A concentração de hidróxido de lítio não deveria exceder 5,3 M, que representa o produto de solubilidade de hidróxido de lítio. Quando a concentração de LiOH exceder 5,3 M, cristais de sal serão formados e precipitados na superfície do óxido. Na etapa c) do método de acordo com a invenção, é dese-

jado que os íons se tornem incorporados no óxido, e conseqüentemente a concentração de LiOH não deveria exceder o produto de solubilidade.

Uma concentração preferida de hidróxido de lítio está dentro da faixa dentre 0,05 a 2 M.

5 As etapas de formar íons negativamente carregados na superfície de óxido e trazer a referida camada de óxido em contato com íons de lítio, desse modo incorporando íons de lítio na camada de óxido revestindo a superfície do implante não está limitada a um método específico porém pode ser obtida por qualquer método adequado, ou qualquer combinação de métodos. Por exemplo, a superfície de implante pode ser anodizada em uma solução alcalina compreendendo íons de lítio. O exemplo 1 ilustra a incorporação de íons de lítio por anodização em hidróxido de lítio.

15 Submetendo-se a superfície de implante a uma etapa de anodização, as espessuras da camada de óxido serão afetadas. Entretanto, quando a anodização é preferivelmente realizada com uma taxa de varredura relativamente baixa, por exemplo abaixo de 6 mV/s até alcançar 8V, as espessuras do óxido não crescerá mais grossa do que 100 nm.

20 Conseqüentemente, íons de lítio estão incorporados na camada de óxido por meios da interação eletrostática entre grupos hidróxido negativamente carregados formados na superfície de implante e íons de lítio positivamente carregados presentes em uma solução circundante.

25 Opcionalmente, o método de acordo com a invenção pode compreender a etapa de enxaguar e/ou limpar a referida superfície de implante depois da etapa d). Além disso, a superfície de implante pode ser secada e esterilizada depois da referida etapa de enxague.

30 Em modalidades, o método de acordo com a invenção também compreende a etapa de formar um depósito compreendendo um agente estimulador de osso tal como lítio, estrôncio, cálcio, magnésio no topo da referida camada de óxido, por exemplo precipitando-se um sal compreendendo os íons mencionados acima na superfície do implante; isto é na camada de óxido revestindo a referida superfície.

O sal pode ser qualquer sal adequado dos íons acima que é pelo

menos em parte solúvel no fluido fisiológico que cerca o implante. A precipitação de um sal na superfície de implante formará uma película contínua ou uma não-contínua na superfície. As espessuras do depósito dependerão da quantidade de sal precipitado.

5 Um tal depósito de sal dissolve facilmente e rapidamente em contato com o fluido fisiológico que cerca o implante tal que os efeitos estimulante de osso desejado é obtido pela liberação de íons estimuladores de osso a partir da superfície de implante.

10 Quando o depósito for uma precipitação de sal de lítio, a etapa de formar um tal depósito pode ser obtida modificando-se os métodos descritos acima para formar íons negativamente carregados na superfície da camada de óxido. Por exemplo, um potencial mais negativo do que -3,5 V pode ser aplicado. Um tal potencial negativo dá origem a um desenvolvimento de gás hidrogênio significativamente aumentado e um rompimento au-
15 mentado de moléculas de água. Conseqüentemente, um excesso de grupos hidróxido de ligação de superfície negativamente carregados, são formados na superfície de óxido resultando em um depósito, isto é um precipitado de hidróxido de lítio sobre a camada de óxido. Vide exemplo 2 para outra descrição.

20 Além disso, submetendo-se à superfície de implante a uma solução compreendendo hidróxido de lítio em uma concentração sobre o produto de solubilidade de 5,3 M, um depósito de sal de lítio será formado na superfície de óxido (superfície de implante). Isto é da mesma forma devido ao excesso de grupos hidróxido o cercando.

25 Entretanto, a etapa de formar um depósito de por exemplo um sal de lítio não está limitada a qualquer método específico, porém qualquer método pode ser usado. Não é limitado a um sal de lítio específico, porém qualquer sal que é pelo menos em parte solúvel no fluido fisiológico que cerca um implante pode ser usado.

30 Além disso, qualquer método para formar uma precipitação de sal compreendendo qualquer ou uma combinação dos íons selecionados a partir de lítio, estrôncio, magnésio e cálcio pode ser usado, por exemplo a

solução que compreende lítio pode da mesma forma compreender qualquer ou uma combinação dos íons mencionados acima. Em tais casos, uma quantidade pequena destes íons pode da mesma forma ser incorporada na camada de óxido.

5 A etapa de formar um depósito pode da mesma forma ser realizada por uma combinação dos métodos mencionados acima.

 Deveria entretanto ser notado que métodos conhecidos para incorporação de íon e formação de depósito em uma superfície de implante podem da mesma forma ser usados na presente invenção. Tais métodos
10 incluem por exemplo:

- depósito de plasma, por exemplo usando implantação de íon de fonte de plasma ou implantação de íon de imersão de plasma de metal,
 - qualquer tratamento eletroquímico, por exemplo, voltametria em um eletrólito compreendendo íons de lítio,
 - 15 - tratamento do implante com uma solução aquosa e/ou não aquosa compreendendo íons de lítio, por exemplo imergindo-se o referido implante na referida solução,
 - tratamento do implante com uma técnica de sol-gel,
 - implantação de feixe de íon,
 - 20 - arco a vácuo,
 - arco a vácuo filtrado,
 - arco a vácuo de vapor de metal,
 - revestimento de íon,
 - depósito de vapor químico,
 - 25 - depósito de vapor químico assistido por plasma,
 - borrifação,
 - separação a laser,
 - fornecer um revestimento, tal como um revestimento contendo fosfato de cálcio ou um revestimento de silano, na superfície de implante, em ou ao
30 qual íons de lítio podem ser incorporados ou fixados,
- qualquer combinação destes métodos ou similar. O método de acordo com a invenção pode também compreender a etapa de criar uma microaspereza na

superfície de implante.

Antes de, simultaneamente com e/ou depois da condição de íons de lítio ou um sal dos mesmos na superfície de implante, uma nano e/ou microaspereza pode ser opcionalmente fornecidas na superfície de implante usando, por exemplo, cauterização moderada, microfabricação, anodização, pulverização de chama, tratamento eletroquímico, *laser*, erosão de faísca, ou qualquer outro método adequado de modificação de superfície.

Referência pode ser feita ao WO 04/008983 e WO 04/008984, em que, métodos adequados para obter uma tal superfície de implante são descritos. É preferido, entretanto, que a nano- e/ou microaspereza seja fornecida depois da etapa a) no método de acordo com a invenção.

O método da invenção pode da mesma forma compreender a etapa de aplicar flúor à superfície de implante. Referência pode ser feita ao WO 04/008983, em que métodos adequados para obter uma tal superfície de implante são descritos.

Um método adequado, de acordo com WO 04/008983, para fornecer flúor e/ou fluoreto e uma microaspereza tendo uma aspereza de raiz quadrada média (R_q e/ou S_q) de ≤ 250 nm em pelo menos uma parte de uma superfície de implante é por tratamento do implante com uma solução aquosa de ácido fluorídrico tendo uma concentração menor do que 0,5 M, tal como de 0,1 M, durante um período de cauterização de até 180 segundos, tal como 60s, à temperatura ambiente (vide WO 04/008983 para mais informação).

Além disso, uma macroaspereza pode ser opcionalmente fornecida na superfície de implante antes de fornecer íons de lítio ou um sal dos mesmos, e antes de opcionalmente fornecer a microaspereza, da mesma. Uma macroaspereza pode, por exemplo, ser fornecida explodindo-se, com partículas de dióxido de titânio, gravando, microfabricação, anodização, pulverização de chama, qualquer tratamento eletroquímico, *laser*, erosão de faísca, usinagem, carretilhamento, ou qualquer outro método adequado de modificação de superfície.

Da mesma forma será notado que a superfície de implante pode

ser enfiada ou desenfiada ou ser dado a outras características topográficas dependentes de uso.

O método para fabricar um implante de tecido ósseo de acordo com a invenção não está limitado à incorporação de íons de lítio, porém pode ser aplicado para incorporar íons positivamente carregados na superfície de implante em geral. Consequentemente, um tal método envolve as etapas de:

- a) fornecer um implante tendo uma superfície de implante;
- b) formar uma camada de óxido revestindo à referida superfície de implante;
- 10 c) formar íons negativamente carregados na referida camada de óxido; e
- d) trazer a referida camada de óxido em contato com íons positivamente carregados.

A presente invenção também refere-se a um pó explosivo, que compreende um óxido de metal, em que o óxido de metal compreende íons de lítio.

O óxido de metal pode ser um óxido de metal selecionado a partir do grupo que consiste em óxido de titânio, óxido de zircônio, óxido de háfnio, óxido de tântalo, e óxido de nióbio. Preferivelmente o pó explosivo compreende óxido de titânio em que íons de lítio são incorporados.

É da mesma forma possível simplesmente usar óxido de lítio como o pó explosivo da presente invenção.

Pode ser possível usar o referido pó explosivo no método de acordo com a invenção para também aumentar a incorporação de íons de lítio na camada de óxido revestindo a superfície de implante. Entretanto, um pó explosivo pode ser usado por si próprio para incorporar íons de lítio em qualquer camada de óxido fornecida em qualquer superfície de implante.

A presente invenção da mesma forma refere-se a um método para localmente aumentar a formação óssea. Um tal método compreende administrar uma composição compreendendo íons de lítio ou um sal do mesmo e um veículo farmacologicamente aceitável a uma pessoa em necessidade do mesmo. Preferivelmente, a composição compreendendo íons de lítio ou um sal da mesma e um veículo farmacologicamente aceitável é admi-

nistrada em um local de implantação na implantação de um implante em tecido ósseo no referido local de implantação antes de, simultaneamente com e/ou depois que do referido implante é colocado em uma cavidade no tecido ósseo no referido local.

- 5 A composição compreendendo íons de lítio, ou um sal da mesma, pode ser administrada na e/ou próximo a referida cavidade no tecido ósseo.

10 Exemplos de veículos farmacologicamente aceitáveis adequados para uso na referida composição são uma solução salina fisiológica; osso autólogo desintegrado; uma matriz de osso desmineralizada; lipossomas; nano ou micropartículas de polímero(s) biodegradável(is), tal como ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA); ácido hialurônico; colágeno; sulfato condroitina; um hidrogel, tal como alginato; quitosana; uma sustentação de poliéster e fosfato de tricálcio; e similares.

- 15 Um exemplo específico de um veículo adequado é PepGen P-15 PUTTY®, que são partículas de hidroxiapatita aumentadas com P-15, um peptídeo sintético que imita a região de ligação de célula de colágeno Tipo-I, suspenso em hialuronato de sódio.

20 A composição de acordo com a invenção pode ser uma liberação imediata, uma liberação atrasada ou uma formulação de liberação controlada.

A invenção da mesma forma refere-se ao uso de íons de lítio, ou um sal dos mesmos, para fabricar uma composição farmacêutica (como descoberto acima) para localmente aumentar a formação óssea.

- 25 A composição pode ser localmente administrada em um local de implantação na implantação de um implante em tecido ósseo no referido local.

30 De acordo com os presentes inventores, administração local de íons de lítio ou um sal do mesmo diretamente no tecido ósseo é preferida na administração sistêmica. Agentes externos frequentemente têm uma variedade de efeitos no corpo humano, que são igualmente conhecidos e desconhecidos. Administração local de lítio ou um sal do mesmo em tecido ósseo

é benéfica como o efeito estimulante de osso será obtido, enquanto efeitos colaterais são evitados.

Além disso, a invenção refere-se a um *kit* para implantação de um implante em tecido ósseo compreendendo um implante e uma composição (como descrito acima) compreendendo íons de lítio, ou um sal dos mesmos, e um veículo farmacologicamente aceitável.

Enquanto a invenção foi descrita em detalhes e com referência às modalidades específicas da mesma, ficará evidente para alguém versado na técnica que várias mudanças e modificações podem ser feitas aqui sem partir do espírito e escopo da mesma.

A invenção será agora ilustrada por meios dos seguintes exemplos não limitantes.

Exemplos

Exemplo 1: incorporação de íons de lítio em uma camada de óxido de titânio.

15 **Redução em LiNO_3**

Amostras de titânio foram reduzidas por técnica de etapa potencial em LiNO_3 a 0,1 M, pH de 5-6. Uma etapa potencial de -3V (todos os potenciais são referidos a um eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl de junção dupla, 197 mV contra SHE) foi aplicada sobre uma amostra durante 5 minutos resultando em uma evolução de hidrogênio contínua. Depois do processo de redução as amostras foram enxaguadas com MQ água em um banho ultrassônico durante 2 minutos antes da secagem e esterilização. A presença e distribuição de lítio foram identificadas por Espectrometria de Massa de Íon Secundário de Tempo de Trajetória (TOF-SIMS) (figura 1).

25 **Anodização em uma solução alcalina**

Amostras de titânio foram anodizadas em de LiOH a 0,1 M, pH >11 por LSV (voltametria de varredura linear) de OC (circuito aberto) a 7V (todos os potenciais são referidos a um eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl de junção dupla, 197 mV contra SHE), em uma taxa de varredura de 2 e/ou 5mV/s e uma velocidade de rotação de 900 rpm. Depois do processo de anodização as amostras foram enxaguadas em água MQ em um banho ultrassônico durante 2 minutos antes da secagem e esterilização.

A presença de lítio na superfície de uma amostra de titânio esterilizada é ilustrada pelo espectro de massa na figura 2a (pico 7), e comparado a uma amostra de referência de uma amostra de titânio esterilizada tratada com ácido oxálico (figura 2b).

5 A presença e distribuição de lítio foram identificadas por TOF-SIMS (figura 3).

Exemplo 2: Liberação de lítio a partir de uma superfície de implante de titânio.

10 Amostras de titânio foram reduzidas por técnica da etapa potencial em 0,1 M de LiNO_3 , pH 5-6. Uma etapa potencial mais negativa do que -4V (todos os potenciais são referidos como a um eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl de junção dupla, 197 mV contra SHE) foi aplicada sobre uma amostra durante 5 minutos resultando em evolução de hidrogênio vigorosa. Depois do processo de redução as amostras foram enxaguadas em água e
15 secadas.

A liberação de lítio foi identificada por ISE (Eletrodo Seletivo de Íon) e ICP (Plasma Industrialmente Acoplado). Quatro amostras moldadas por moeda, preparadas de acordo com o anterior, foram colocadas em um béquer com 15 ml de água MQ. A água foi acidificada em pH 4 usando
20 HNO_3 a 20mM e depois disso deixada durante 90 minutos com agitação moderada antes da análise. A solução foi analisada usando ISE e ICP, ambas as análises produzindo o mesmo resultado de 0,4. μg de lítio/ml de amostra.

Exemplo de referência 1:

Cultura de células MG-63

25 MG-63 é uma linhagem celular humana (ATCC No CRL-1427, US) convencionalmente usada na técnica para estudos *in vitro* de osteoblastos. MG-63 origina-se de um osteossarcoma humano e exibe numerosas características de traço de osteoblastos humanos, tal como fosfatase alcalina (ALP), e osteoprotegerina (OPG).

30 Neste estudo, células MG-63 foram obtidas a partir de células congeladas em segunda passagem e também cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo FCS a 5%, PEST a 1%, Gibco,

UK) a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Quando as células alcançaram a confluência, elas foram subcultivadas pelo uso de 0,05% de Tripsina-EDTA (Gibco, UK) até uma quantidade de células ser obtida.

5 A viabilidade celular foi alta em todas as experiências (>98%) e foi conferida pelo uso de azul tripano onde a captação da mancha por células mortas foi conferida em um Burkerchamber em um microscópio de luz (LM).

Exemplo de Referência 2:

10 Proliferação de células MG-63 e produção de fosfatase alcalina (ALP).

Para estudar o efeito de lítio na proliferação de células MG-63 e a produção de fosfatase alcalina (ALP), células MG-63 preparadas no exemplo de referência 1 foram subcultivadas em placas de 24 cavidades em uma densidade de revestimento de 10.000 células/cm², no total 20 000 células/cavidade. LiNO₃ filtrado estéril em concentrações finais de 10 mM, 5 mM, 15 3 mM, e 1 mM respectivamente (pH 5,2) foram adicionados às cavidades respectivas da placa. As células não-tratadas foram usadas como controles. As células foram cultivadas durante 3, 7 e 14 dias em uma temperatura de 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

20 O número total de células em cada cavidade ($\times 10^5$) depois que cada período de tempo foi determinado pelo método de NucleoCassette pelo NucleoCounter (ChemoMetec A/S Denmark).

O número de células foi investigado por lise das células em "Reagent A" tendo um pH de 1,25 seguindo a estabilização pelo "Reagente B".
25 No NucleoCassette, iodeto de propídio foi incorporado, o qual direciona a quantidade de DNA liberado. O cassete foi colocado no NucleoCounter e a quantidade de fluorocromo medido corresponde à quantidade de DNA. As instruções do fabricante foram seguidas (Chemometec A/S, Denmark).

30 Na colheita, o meio de cultura celular foi analisado com respeito ao teor de ALP. O ALP intracelular foi medido por lise celular de acordo com as instruções do fabricante (SenzoLyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit Colorimetric BioSite, Sweden). A absorção foi fixada em 405 nm por uma

leitora de placa automática (Vmax, Maciocular Device, UK). Comparando-se a densidade ótica das amostras com o padrão fornecido com o *kit*, as concentrações de ALP podem ser determinadas. As instruções do fabricante foram seguidas (BioSite, Sweden).

5 Referindo-se à figura 4, uma proliferação aumentada de células MG-63 foi obtida em todos os três pontos de tempo com 5, 3 e de lítio a 1 mM. O número de célula detectada mais alto foi observado depois de 7 dias.

A produção de ALP foi inicialmente lenta com todas as concentrações de lítio comparadas ao controle (células não-estimuladas). Um aumento pequeno foi detectado depois de 7 dias comparado ao controle. Entretanto, os níveis de ALP aumentados foram detectados depois de 14 dias com todas as concentrações de lítio; 1 mM, 3 mM, 5 mM e 10 mm. A quantidade mais alta de ALP foi observada com 1 mM de lítio depois de 14 dias. Os resultados são ilustrados na figura 5.

15 Exemplo de referência 3:

Preparação de superfícies de referência:

Amostras de titânio tendo a forma de uma moeda foram limpas, e em seguida imersas em uma solução aquosa de ácido oxálico a 1 M e deixada em 80°C durante 30 minutos sob agitação vigorosa. Depois de 30 minutos, as amostras foram removidas da solução de ácido oxálico e enxaguadas em água seguido por enxágue em água em um banho ultrassônico durante 2 minutos. A superfície resultante é chamada "superfície de referência 1".

Algumas amostras foram submetidas a um tratamento com ácido fluorídrico secundário. Aproximadamente 10 minutos depois de enxaguar, as amostras foram imersas em solução aquosa HF a 0,1 M em temperatura ambiente e agitação até o começo da dissolução ativa, seguido por um tempo de tratamento ativo adicional de 40s. Em seguida, as amostras foram removidas da solução de HF e enxaguadas em água seguido por enxágue em água em um banho ultrassônico durante 2 minutos. As amostras foram secadas em ar em temperatura ambiente durante cerca de 60 minutos antes da esterilização. A superfície resultante é referida como "superfície de refe-

rência 2".

Exemplo de referência 4:

Proliferação de MG-63 em superfícies de referência

Moedas de Ti esterilizadas (β -radiação) com as superfícies de referência 1 e 2, respectivamente foram colocadas em placas de 24 cavida-
5 des. Células MG-63 foram subcultivadas sobre as moedas nas placas de 24 cavidades em uma densidade de semeadura de 10.000 células/cm², no total 20 000 células/cavidades. LiNO₃ filtrado estéril em concentrações finais de 5mM e 1 mM (pH 5,2) foi adicionada às cavidades respectivas. As células
10 não-tratadas foram usadas como controles. As células foram cultivadas durante 7 dias em uma temperatura de 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

A superfície de referência 1 compreendendo lítio em uma concentração de 1 mM induziu uma proliferação aumentada de células MG-63
15 depois de 7 dias de cultura. A superfície de referência 2 compreendendo lítio em uma concentração de 1 mM induziu uma proliferação celular alta depois de 7 dias de cultura celular comparada à referência da superfície não-estimulada 2. A concentração final de lítio a 5 mM induziu uma proliferação aumentada modesta. Os resultados são ilustrados na figura 6.

20 Exemplo de referência 5:

Produção de ALP em superfície de referência 1

A produção de ALP na superfície de referência 1 compreendendo uma concentração de lítio a 1 mM foi comparada com a superfície de referência não-estimulada 1 não compreendendo lítio.

25 Como é ilustrado na figura 7, a produção de ALP aumentou com lítio a 1 mM depois de 7 dias de cultura celular.

Exemplo de referência 6:

Morfologia

Amostras de titânio tendo (i) superfície de referência 1 (ii) superfície de referência 2, e (iii) superfície de referência 1 + lítio foram preparados
30 para Microscopia de Elétron de Varredura (SEM). As amostras foram fixadas por glutaraldeído a +4°C (Kanowsky's), seguido por tetróxido de ósmio, de-

sidratação e finalmente ouro lançado de acordo com as técnicas padrão.

As figuras 8, 9, e 10 ilustram a morfologia da superfície respectiva depois de 36h. A superfície de referência 1 compreendendo lítio tem uma quantidade maior de células na fase proliferativa (Figura 10) (células não dispersas, redondas) bem como uma quantidade grande de células adesivas comparadas às células na superfície de referência 1 e 2 não compreendendo lítio. Tanto na superfície de referência 1 (figura 8) quanto na superfície de referência 2 (figura 9), as células são mais finas, mais planas e mais dispersas.

O espaço entre as células nas superfícies de referência 1 e 2 é provavelmente devido às dificuldades de fixação e é visto frequentemente quando as células são muito finas e dispersas.

A morfologia das células cultivadas na superfície de referência 1 compreendendo lítio mostra que as células são bem-dispersas, indicando atividade alta, proliferativa, e formam a matriz e *pseudopodia* nas superfícies. Isto indica que tais superfícies são osteocondutivas bem como osteoindutivas e favorecem a adesão celular, proliferação e formação de matriz.

Exemplo comparativo 1:

Proliferação de MG-63 em superfícies de referência compreendendo lítio, cálcio e magnésio, respectivamente

Moedas de Ti esterilizadas (β radiação) com superfícies de referência 1 e 2 foram comparadas com moedas de Ti com superfície de referência 1 compreendendo lítio, cálcio e magnésio, respectivamente, e as moedas foram colocadas em placas de 24 cavidades. As células MG-63 foram subcultivadas sobre as moedas nas placas de 24 cavidades em uma densidade de semeadura de 10.000 células/cm², no total 20.000 células/cavidade. As células foram cultivadas durante 7 dias em uma temperatura de 37°C em uma atmosfera de CO₂ a 5% e 100% de umidade.

O número total de células em cada cavidade ($\times 10^5$) depois que cada período de tempo foi determinado pelo método de NucleoCassette pelo NucleoCounter (ChemoMetec A/S Denmark).

O número de células foi investigado por lise das células no "Re-

agente A" tendo um pH de 1,25 seguindo a estabilização pelo "Reagente B". No NucleoCassette, iodeto de propídio foi incorporado, o qual direciona a quantidade de DNA liberado. O cassete foi colocado no NucleoCounter e a quantidade de fluorocromo medido correspondeu à quantidade de DNA. As instruções do fabricante foram seguidas (Chemometec A/S, Denmark).

Referindo-se à figura 11, a proliferação com a superfície de referência 1 compreendendo lítio mostrou a proliferação de célula MG-63 alta depois de 7 dias de cultura celular. A proliferação celular foi notadamente mais alta que as superfícies de referência compreendendo cálcio e magnésio.

Exemplo comparativo 2:

Produção de osteoprotegerina na superfície de referência 1

A produção de osteoprotegerina (OPG) foi comparada entre as moedas de Ti com superfície de referência 1 compreendendo lítio, cálcio e magnésio, respectivamente.

A quantidade OPG foi determinada por DuoSet ELISA human OPG/TNFRSF11B (R&D Systems, UK). O sobrenadante de cada cavidade foi centrifugado livre de células (5 min em 400 g) e também usado para investigação. Concentrações de OPG da amostra foram determinadas correlacionando-se as quantidades à curva padrão fornecida pelo fabricante. A sensibilidade do teste (MDD, dose mínima detectável) foi de 50 pg/ml. As instruções do fabricante foram seguidas (R&D Systems, UK).

Como é ilustrado na figura 12, a produção mais alta de OPG foi observada com a superfície de referência 1 compreendendo lítio depois de 7 e 14 dias de cultura celular.

Exemplo Comparativo 3:

Resposta do tecido ósseo *in vivo*

A integração dos implantes de acordo com a invenção foi testada em um modelo de coelho. O objetivo foi qualitativamente e quantitativamente estudar a resposta do tecido ósseo *in vivo* das modificações de superfície de implante de acordo com a invenção comparada a um implante de controle comercialmente disponível.

Implantes para estudo de torque de remoção

Fixações de torque (projeto de torque de remoção de cabeça quadrada, 3,5 x 8,2 mm) com superfície de referência 1 compreendendo lítio foram adquiridas com fixações de torque de controle (3,5x8,2 mm) com a superfície Osseospeed® comercialmente disponível.

Inserção de implante

Doze coelhos brancos da Nova Zelândia machos maduros foram marcados para cirurgia. Dois coelhos morreram durante a anestesia inicial (#9, 10). A cirurgia foi monótona. A perfuração em baixa velocidade (1500 rpg para perfurar os buracos e 20 rpm para inserção de implante) foi feita com resfriamento de NaCl contínuo. A primeira perfuração foi com uma broca redonda pequena e assim usada como um marcador para as próximas brocas em espiral maiores (um total de 6 brocas tendo diâmetros na faixa de 1,2 a 3,35 mm).

Três implantes ("projeto de torque de remoção de cabeça quadrada"; 3,5 x 8,2 mm) foram inseridos em cada tibia de *tuberositas*. Os implantes de tibia foram marcados para testes de torque de remoção.

Resultados de torque de remoção

Depois de seis semanas, o estudo foi terminado e os coelhos foram sacrificados. Os implantes e tecido circundante foram examinados. Os implantes de rtq de tibia foram fáceis de localizar e todos eles mostraram sinais de crescimento de tecido ósseo periosteais. O teste biomecânico da interface implante-osso foi realizado com o teste de torque de remoção (RTQ). O instrumento de RTQ é um equipamento eletrônico (Detektor AB, Göteborg, Sweden) envolvendo um transducer de medida de tensão usado para testar a estabilidade do implante (o pico liberando o torque em Ncm) no leito ósseo e pode desse modo ser considerado como teste tridimensional grosseiramente refletindo a força de cisalhamento interfacial entre o tecido ósseo e o implante (Johansson C. B., Albrektsson T. *Clin Oral implants Res* 1991; 2:24-9). Um torque crescente linear foi aplicado no mesmo eixo do implante até a falta de integração ser obtida e o valor de cume ser notado.

Como é ilustrado na figura 13, o valor de torque de remoção pa-

ra o implante compreendendo lítio de acordo com a invenção foi melhorado comparado à superfície de Osseospeed® comercialmente disponível.

REIVINDICAÇÕES

- 5 1. Implante para a implantação no tecido ósseo tendo uma superfície; a referida superfície sendo revestida por uma camada de óxido caracterizada pelo fato de que a referida camada de óxido compreende íons de lítio.
2. Implante de acordo com a reivindicação 1, em que o referido implante é um implante metálico.
3. Implante de acordo com a reivindicação 2, em que o referido implante metálico compreende titânio ou uma liga de titânio.
- 10 4. Implante de acordo com a reivindicação 1, em que o referido implante é um implante não-metálico; a referida superfície sendo uma camada de implante metálica aplicada.
5. Implante de acordo com a reivindicação 4, em que a referida camada de implante metálica compreende titânio ou uma liga de titânio.
- 15 6. Implante de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a referida camada de óxido tem uma espessura dentro da faixa de 2 a 100 nm.
7. Implante de acordo com a reivindicação 6, em que a referida camada de óxido tem uma espessura dentro da faixa de 2 a 18 nm.
- 20 8. Implante de acordo com a reivindicação 6 ou 7, em que a referida camada de óxido tem uma espessura dentro da faixa de 2 a 6 nm.
9. Implante de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a referida camada de óxido é uma camada de óxido de metal formada da referida superfície do referido implante.
- 25 10. Implante de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes também compreendendo um depósito no topo da referida camada de óxido, em que o referido depósito compreende um agente estimulador de osso.
11. Implante de acordo com a reivindicação 10, em que o referido agente estimulador de osso é selecionado do grupo consistindo em lítio, estrôncio, magnésio e cálcio ou uma combinação dos mesmos.
- 30 12. Implante de acordo com a reivindicação 10 ou 11, em que o

referido depósito é uma precipitação de sal que compreende qualquer uma ou uma combinação de íons selecionados de lítio, estrôncio, magnésio e cálcio.

5 13. Implante de acordo com a reivindicação 12, em que a referida precipitação de sal é uma precipitação de sal de lítio.

14. Implante de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o referido implante necessita de uma camada que compreende um composto de fosfato de cálcio.

10 15. Implante de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a referida superfície do referido implante compreende uma microaspereza.

16. Implante de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a referida superfície do referido implante compreende flúor.

15 17. Método para fabricar um implante de tecido ósseo tendo uma superfície de implante revestida por uma camada de óxido que compreende íons de lítio, o referido método compreendendo as etapas de: a) fornecer um implante que tem uma superfície de implante; b) formar uma camada de óxido revestindo a referida superfície de implante; c) formar íons
20 negativamente carregados na referida camada de óxido; e d) trazer a referida camada de óxido em contato com íons de lítio.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que a referida camada de óxido é formada espontaneamente.

25 19. Método de acordo com a reivindicação 17 ou 18, em que os referidos íons negativamente carregados na referida camada de óxido são formados submetendo a referida superfície de implante a um ambiente alcalino.

30 20. Método de acordo com a reivindicação 19, em que o referido ambiente alcalino é formado submetendo a referida superfície de implante a uma solução alcalina.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-19, em que os referidos íons negativamente carregados na referida ca-

mada de óxido são formados aplicando-se um potencial dentro da faixa de $-0,5$ V a $-3,5$ V.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-21, em que a referida etapa c e a referida etapa d são realizadas simultaneamente.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-22, em que a referida camada de óxido é trazida em contato com íons de lítio submetendo a referida camada de óxido a uma solução que compreende íons de lítio.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, em que a referida solução compreende hidróxido de lítio.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que a referida solução compreende hidróxido de lítio em uma concentração de $5,3$ M ou menor.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que a referida solução compreende hidróxido de lítio em uma concentração na faixa de $0,05$ a 2 M.

27. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-26, também compreendendo a etapa de formar um depósito que compreende um agente estimulador de osso no topo da referida camada de óxido.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, em que o referido agente estimulador de osso é selecionado do grupo que consiste em lítio, estrôncio, cálcio e magnésio ou uma combinação dos mesmos.

29. Método de acordo com a reivindicação 27 ou 28, em que o referido depósito é formado precipitando-se um sal compreendendo qualquer uma ou uma combinação dos íons selecionados de lítio, estrôncio, cálcio e magnésio na referida camada de óxido.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, em que o referido sal é hidróxido de lítio.

31. Método de acordo com a reivindicação 29 ou 30, em que o referido depósito é formado aplicando-se um potencial que é mais negativo que $-3,5$ V.

32. Método de acordo com a reivindicação 29 ou 30, em que o referido depósito é formado submetendo a referida superfície de implante a uma solução alcalina que compreende hidróxido de lítio em uma concentração maior que 5,3 M.

5 33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-32, também compreendendo a etapa de criar uma microaspereza na referida superfície do referido implante depois da etapa a).

10 34. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-33, também compreendendo a etapa de aplicar flúor à referida superfície do referido implante.

35. Pó explosivo compreendendo um óxido de metal, em que o referido óxido de metal compreende íons de lítio.

36. Pó explosivo de acordo com a reivindicação 35, em que o referido óxido de metal é dióxido de titânio.

15 37. Pó explosivo de acordo com a reivindicação 35, em que o referido óxido de metal é óxido de lítio.

20 38. Método para localmente aumentar a formação óssea administrando-se uma composição que compreende íons de lítio ou um sal dos mesmos e um veículo farmacêuticamente aceitável para uma pessoa em necessidade do mesmo.

25 39. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a referida composição é administrada em um local de implantação na implantação de um implante no tecido ósseo no referido local de implantação antes de, simultaneamente com e/ou depois do referido implante ser colocado em uma cavidade no tecido ósseo no referido local.

40. Uso de íons de lítio ou um sal dos mesmos para fabricar uma composição farmacêutica para localmente aumentar a formação óssea.

30 41. Uso de acordo com a reivindicação 40, em que a referida composição é administrada localmente em um local de implantação na implantação de um implante no tecido ósseo no referido local.

42. *Kit* para implantação de um implante no tecido ósseo que compreende um implante caracterizado pelo fato de que o referido *kit* tam-

bém compreende uma composição compreendendo ions de lítio ou um sal dos mesmos e um veículo farmacêuticamente aceitável.

1/10

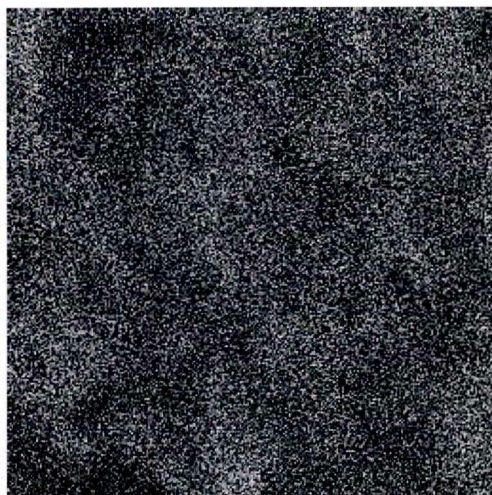


Fig. 1

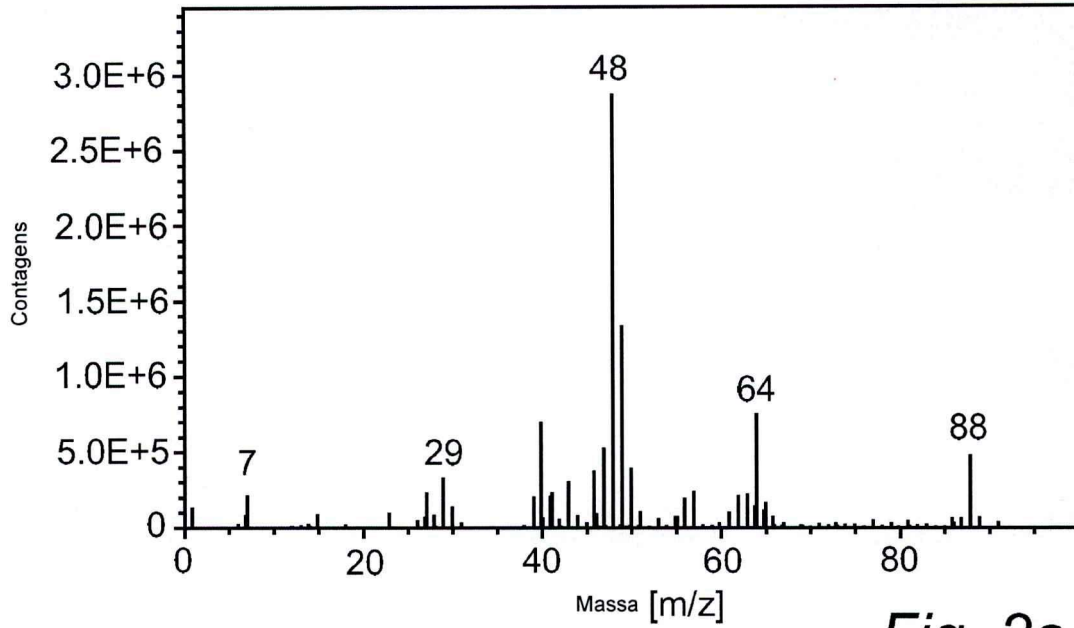


Fig. 2a

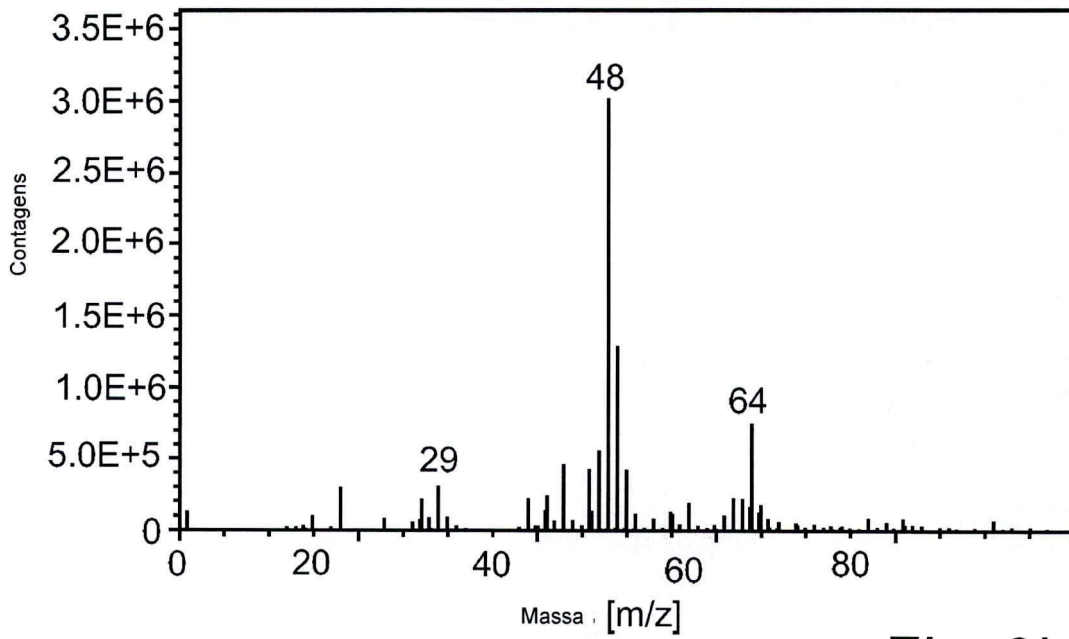


Fig. 2b

3/10

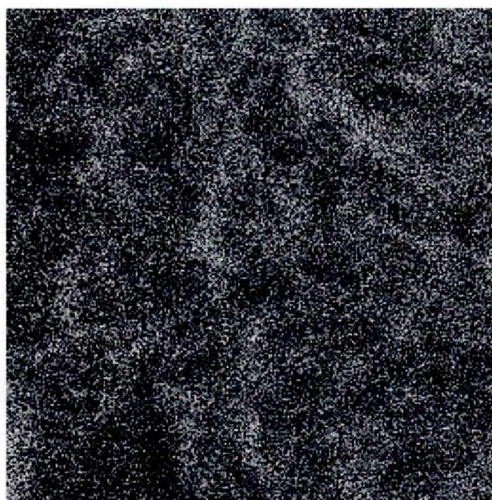
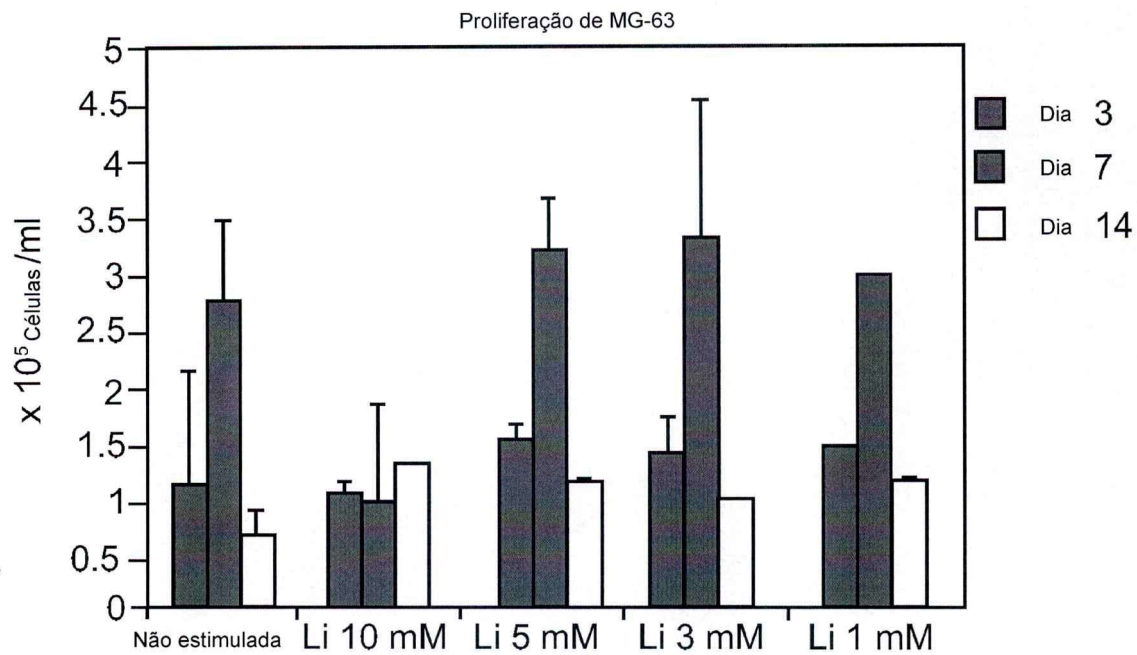
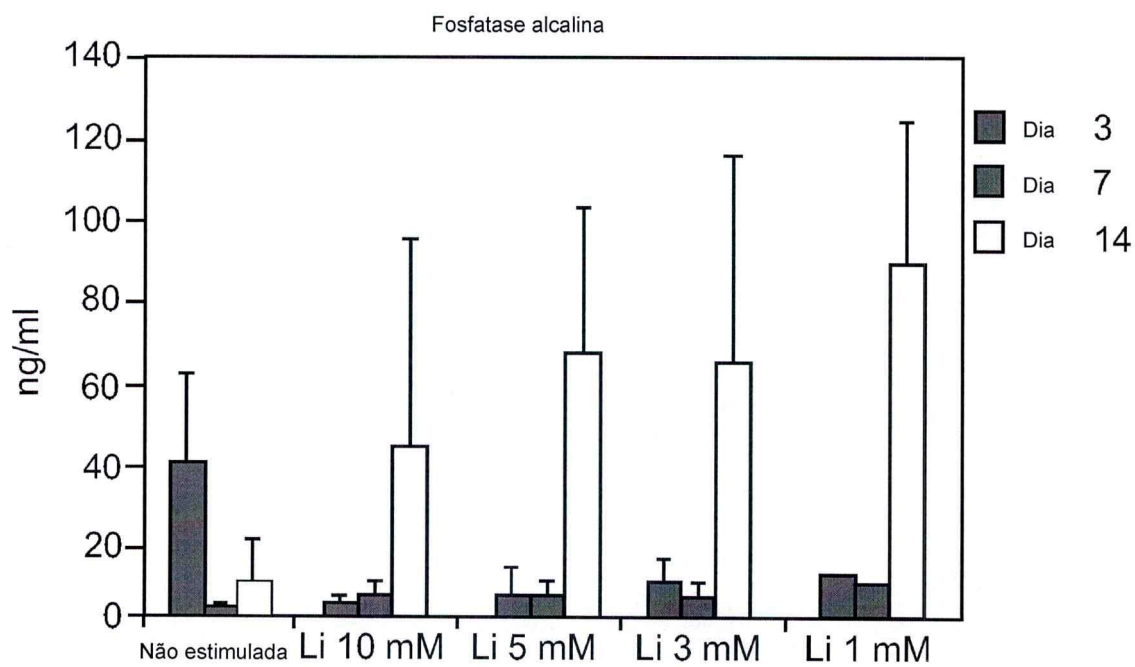
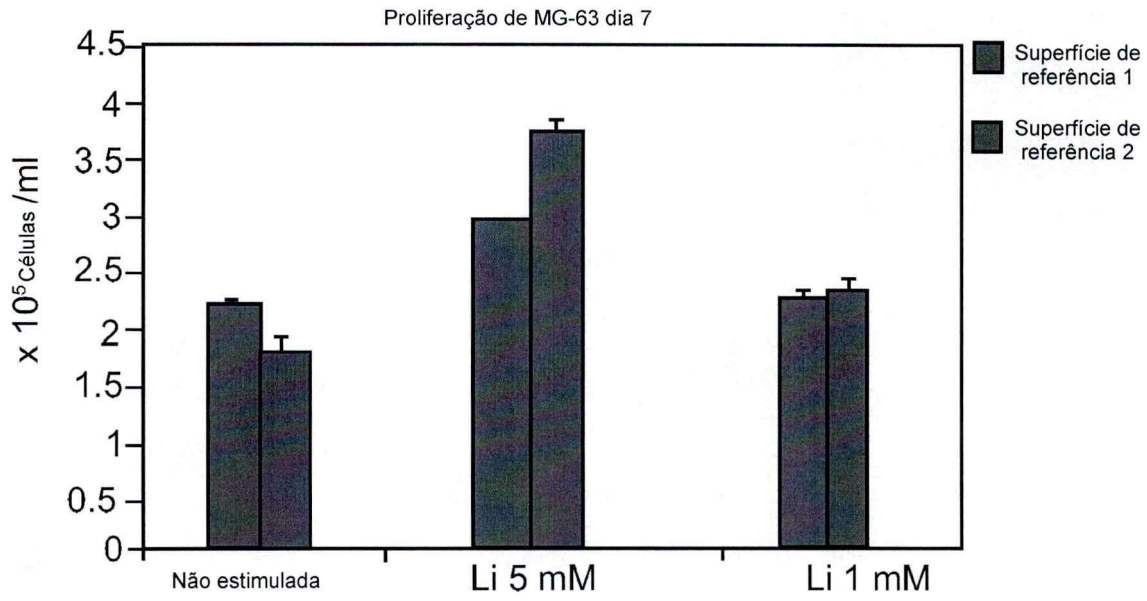
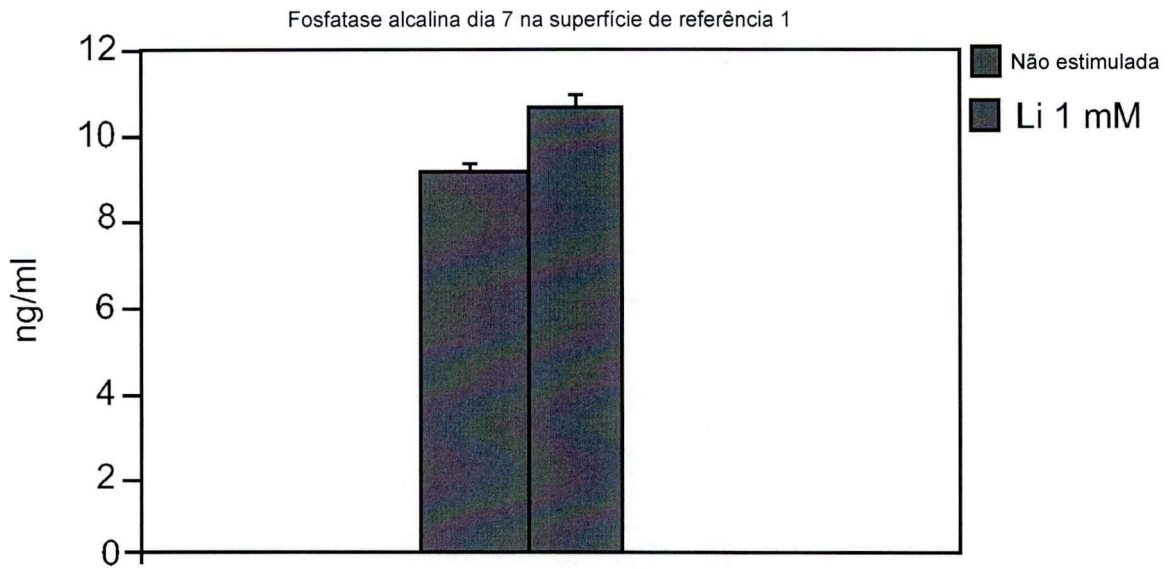


Fig. 3

*Fig. 4**Fig. 5*

*Fig. 6**Fig. 7*

6/10

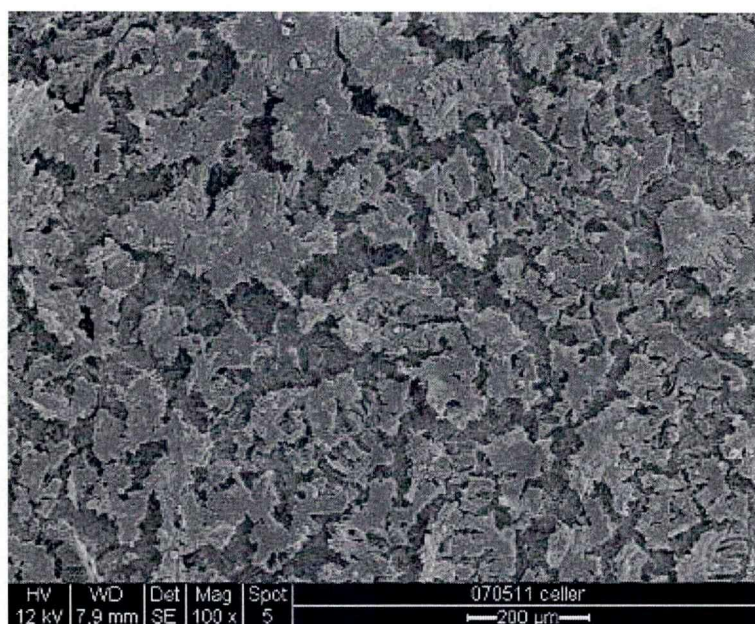


Fig. 8

7/10

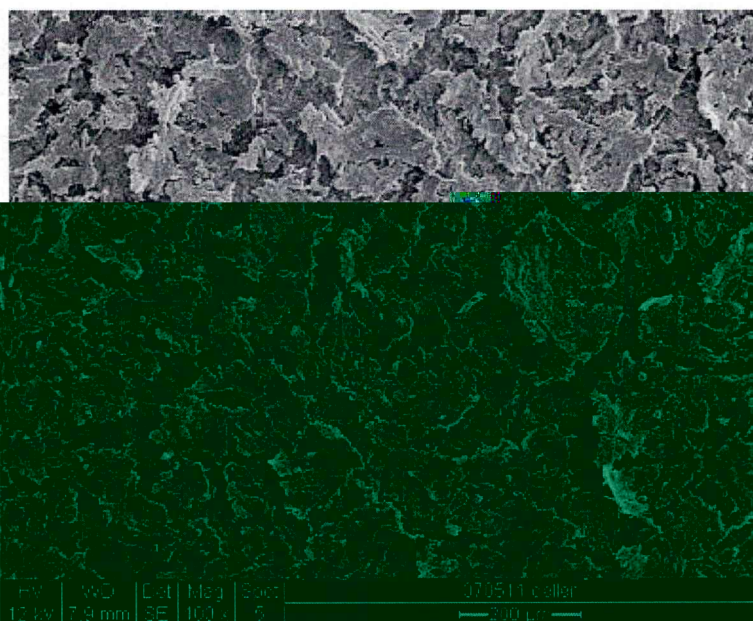


Fig. 9

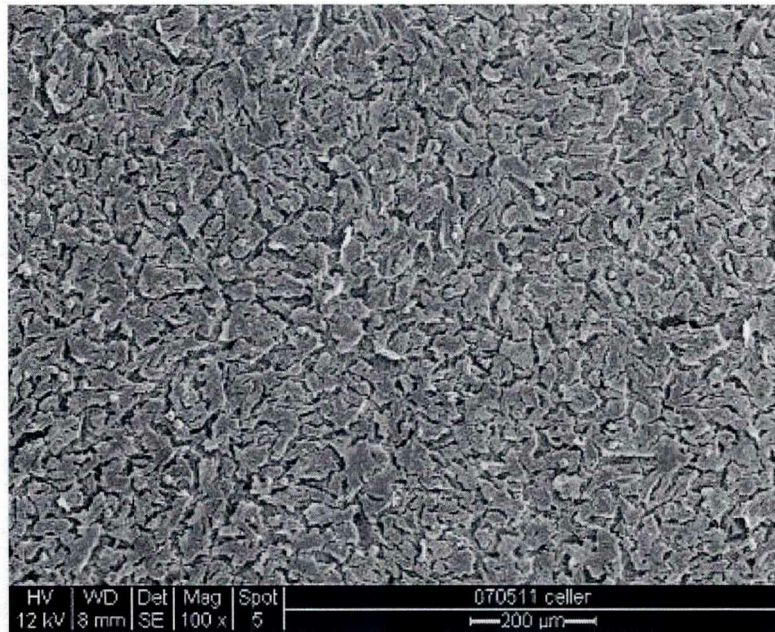


Fig. 10

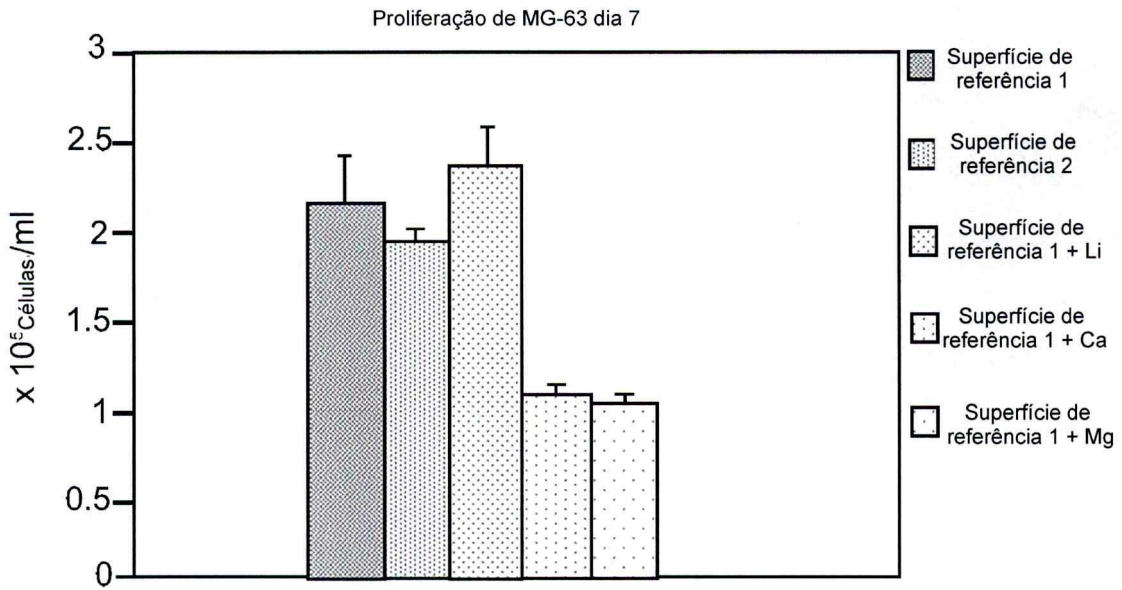


Fig. 11

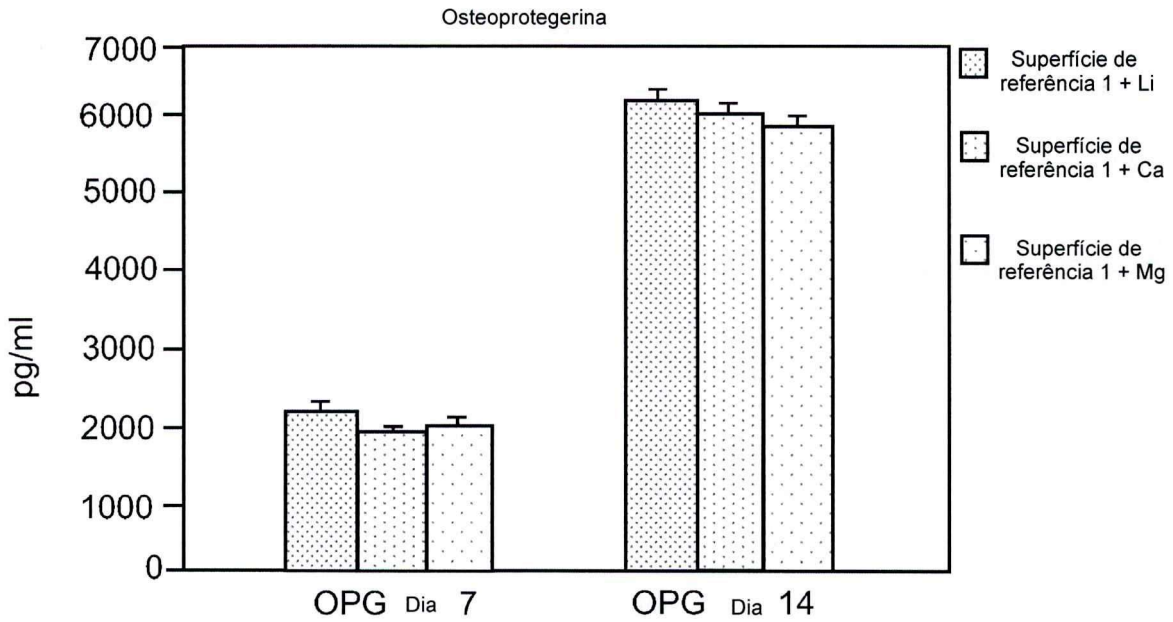


Fig. 12

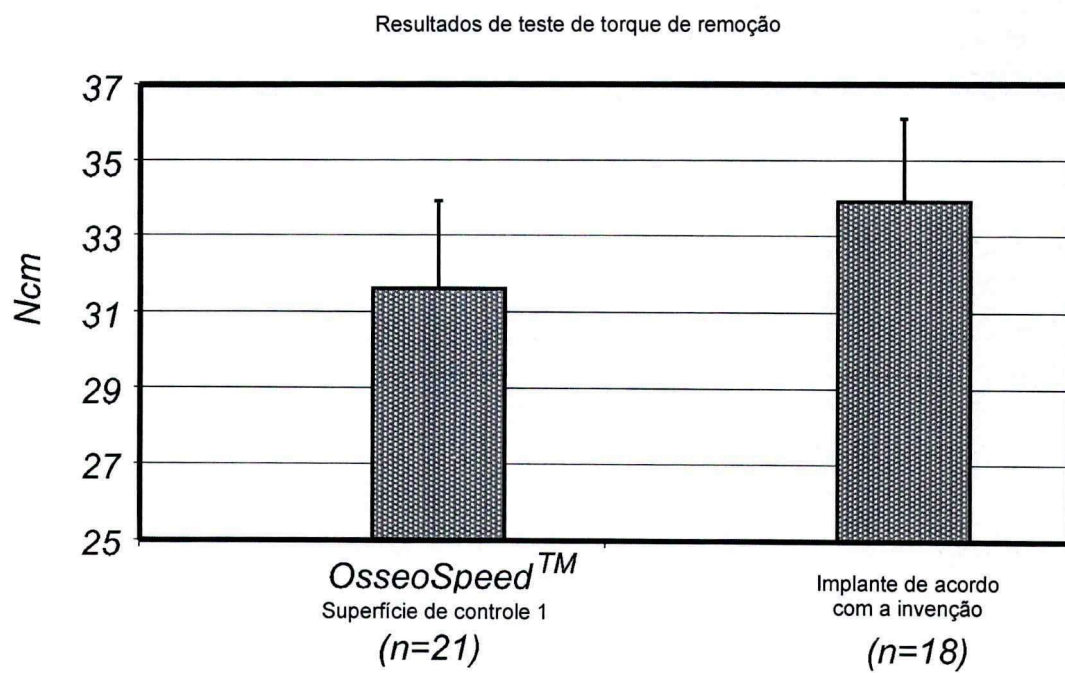


Fig. 13

RESUMO

Patente de Invenção: **"IMPLANTE DE TECIDO ÓSSEO COMPRE-
ENDENDO ÍONS DE LÍTIO"**.

5 A presente invenção refere-se à administração local de íons de
lítio no tecido ósseo que foi constatada melhorar a formação óssea e massa
óssea na implantação de um implante de tecido ósseo no referido tecido ós-
seo. Em particular, a invenção refere-se a um implante de tecido ósseo ten-
do uma superfície de implante revestida por uma camada de óxido que com-
preende íons de lítio e um método para a manufatura do mesmo. Um pó ex-
10 plosivo compreendendo íons de lítio, um método para localmente aumentar
a formação óssea, e o uso de íons de lítio ou um sal é fornecido para fabri-
car uma composição farmacêutica para localmente aumentar a formação
óssea são da mesma forma fornecidos pela presente invenção.