



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 304**

51 Int. Cl.:
A61L 27/50 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02742644 .4**
96 Fecha de presentación : **04.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1426066**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2004**

54 Título: **Producto de almacén para ingeniería de tejido óseo humano, procedimientos para su preparación.**

30 Prioridad: **05.06.2001 CN 01 1 13076**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.04.2011

73 Titular/es: **YENSSEN BIOTECH Co., Ltd.**
10 Dingshan Road, Binjiang Industrial Park
Jiangyin, Jiangsu 214431, CN

72 Inventor/es: **Chou, Laisheng**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 304 T3

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

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a armazones fabricados de materiales compuestos para ingeniería de tejido óseo humano, en particular, a armazones fabricados de materiales médicos compuestos de micropartículas novedosos que tienen la actividad de inducir la regeneración de tejido óseo humano, procedimientos para su preparación para ingeniería de tejido óseo humano.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La ingeniería de tejido óseo humano se refiere al procedimiento de usar materiales biológicos absorbibles como armazones para inducir la regeneración de tejido óseo autólogo. Las propiedades fisicoquímicas y la estructura tridimensional de dichos armazones son factores clave que influyen directamente en la regeneración de tejido óseo. En base al criterio de compatibilidad molecular de materiales biológicos, los materiales de dispositivo de trasplante para cuerpo humano o armazones para ingeniería de tejidos tienen que ser seguros y tener una bioactividad para inducir la regeneración de tejidos humanos pertinentes y la restauración de funciones fisiológicas asociadas a nivel celular y molecular (Chou, y col, J. Cell Sci., 1995, 108: 1563-1573; Chou, y col, J. Biomed. Mater. Res., 1996, 31: 209-217; Chou, y col, J. Biomed. Mater. Res., 1998, 39: 437-445).

20 En la técnica anterior, la combinación de materiales para armazones se selecciona principalmente entre colágeno natural, fosfato de calcio o polímeros orgánicos. El colágeno natural tiene desventajas potenciales de coste elevado, peores propiedades físicas, mayor facilidad para propagar enfermedades e inducir hipersensibilidad en el cuerpo humano (Pachence y Kohn, Biodegradable polymers for tissue engineering en Principles in Tissue engineering, 1997, págs. 273-293). El fosfato de calcio (Kukubo, y col, J. Mater. Science, 1985, 20: 2001-2004; Feinberg, y col, Shanghai Journal de Stomatology, 2000, 9: 34-38 y 88-93) tiene las desventajas de mala retractibilidad y sí muestra la bioactividad de inducir la regeneración de tejido óseo humano (Chou, y col, Biomaterials, 1999, 20: 977-985). Los polímeros orgánicos tales como ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) o compuesto de PLA y PGA (PLGA) también tienen varias desventajas: los productos de degradación ácida liberados de la descomposición de dicho polímero pueden inducir reacción inflamatoria y reacción a cuerpo extraño en tejidos en el cuerpo humano y por tanto influye en la regeneración de tejido óseo. Además, estos polímeros no tienen bioactividad para inducir la regeneración de tejido óseo humano. (Hubel, Bio/Technology, 1995, 13(6): 565-576; Thomson, y col, Polymer scaffolds processing en principles in Tissue Engineering, 1997, págs. 273-293; Cao, y col, Plast Reconstr. Surg. 1997, 100: 297-304; Minuth, y col, Cell Tissue Research, 1998, 291(1): 1-11; Wong Yulai, y col, Shanghai Journal of Stomatology, junio 2000, 9(2): 94-96). En la técnica anterior, existen intentos para injertar algunas proteínas bioactivas, tales como proteína de unión celular o proteína de inducción ósea, en armazones de polímero no activo (Barrea, y col, Macromolecules 1995, 28: 425-432; Ugo y Reddi, Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissue by bone morphogenetic proteins, 1997). Pero estos procedimientos son muy difíciles de llevar a cabo clínicamente debido al coste elevado, la inestabilidad y no uniformidad de las proteínas injertadas y las dificultades para esterilizar los armazones. La Patente de los Estados Unidos 5977204 desvela armazones hechos de un material compuesto que comprende un polímero orgánico y un biovidrio (biocerámica). Dicho biovidrio se desveló en primer lugar en la Patente de los Estados Unidos 4103002. La combinación de silicio, calcio y fósforos se usó en la misma para mejorar la biocompatibilidad entre dicho material y tejido óseo humano, pero no para inducir la regeneración de tejido óseo. De hecho, tanto la Patente de los Estados Unidos 5977204 como la Patente de los Estados Unidos 4103002 no describen de forma definitiva la actividad del silicio para inducir la regeneración de tejido óseo, ni mencionan el efecto inductor sinérgico de calcio y fósforos. Además, los materiales desvelados en ambas patentes comprenden sodio. Sin embargo, el sodio no tiene actividad inductora sobre la regeneración de tejido óseo. Por lo tanto, de acuerdo con los principios de compatibilidad molecular de biomateriales, los armazones reivindicados en la Patente de los Estados Unidos 5977204 no poseen bioactividad significativa para inducir la regeneración de tejido óseo. Adicionalmente, el procedimiento desvelado en dicha patente usa disolventes orgánicos en la preparación de dichos armazones de material compuesto, que pueden dar como resultado citotoxicidad potencial al cuerpo humano. La Patente de los Estados Unidos 6051247 desvela un material compuesto que comprende el biovidrio de la Patente de los Estados Unidos 4103002 y un polisacárido (tal como dextranos) útil en la reparación de defectos óseos. Pero dicho material compuesto se usa solamente para formar pasta o masilla, no siendo adecuado para preparar armazones que tienen estructura tridimensional fina y una tolerancia a la presión determinada para ingeniería de tejidos. Además, la combinación de biovidrio de dicho material compuesto es inactiva para inducir la regeneración de tejido óseo. El biovidrio usado en las Patentes de los Estados Unidos 5977204, 4103002 y 6051247 tiene un tamaño de partícula promedio (diámetro) de más de 70 micrómetros. Las propiedades físicas de los materiales compuestos obviamente están influidas por tales partículas grandes y los elementos inorgánicos no se pueden liberar de forma uniforme durante la descomposición de los materiales compuestos de armazones. Las Patentes de los Estados Unidos 4192021 y 5017627 divulgan un material compuesto que comprende un polímero orgánico y fosfato de calcio, que se puede usar para preparar armazones para reparar defectos óseos. Sin embargo, este material compuesto es inactivo para inducir la regeneración de tejido óseo y la microporosidad y diámetro de poro diseñados para dichos armazones no son adecuados para el implante y regeneración de células óseas. La Patente de los Estados Unidos 5552454 desvela un material compuesto en el que se aplica como revestimiento fosfato de calcio en la superficie de partículas de polímero orgánico. Este diseño ni tiene efecto inductor para la regeneración de tejido óseo, ni se puede usar para conseguir la estructura

tridimensional fina de armazones para ingeniería de tejidos.

La estructura tridimensional de armazones para ingeniería de tejido óseo humano es importante para la regeneración tanto de tejido óseo como de vasos sanguíneos en hueso nuevo. En la técnica anterior, las Patentes de los Estados Unidos 5977204, 4192021, 5017627 y 5552454 todas diseñan armazones como una forma uniforme, porosa o no porosa, en la que la forma de poro, el tamaño de poro y la distribución de poros en unos armazones porosos son uniformes. Sin embargo, tales armazones con poros similares y distribuidos de manera uniforme no son adecuados para la regeneración de tejido óseo. En ejemplos del uso de tales armazones desvelados en la técnica anterior, el diámetro de los poros en los armazones varía de 150 a 400 micrómetros. No es lo suficientemente grande para asegurar que las células humanas entren a la parte central de los armazones. De forma que la regeneración de tejido óseo solamente ocurre 2 a 3 mm alrededor de los armazones. En el otro aspecto, el diámetro de poro relativamente grande (mayor de 400 micrómetros) no es adecuado para la regeneración de tejido óseo (Cartner y Mhiatt, Textbook of Histology, 1997; Tsuruga y col, J. Biochem., 1997, 121: 317-324; Gauthier y col, J Biomed. Mat. Res., 1998, 40: 48-56). De acuerdo con la compatibilidad molecular de biomaterial, la regeneración de vasos sanguíneos en la parte central de los armazones es clave para el crecimiento de hueso nuevo en los armazones, generalmente formándose los vasos sanguíneos únicamente en canales que tienen un diámetro mayor de 400 micrómetros. Por lo tanto, los armazones que tienen poros uniformes en la técnica anterior no pueden satisfacer los requerimientos diferentes de regeneración ósea y regeneración de vasos sanguíneos de forma simultánea y por tanto la aplicación práctica de tales armazones para ingeniería de tejido óseo es limitada.

Por lo tanto, existe una demanda enorme en la técnica anterior de armazones útiles en ingeniería de tejidos humanos, que es bioactivo para inducir la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos, promover la formación y calcificación de hueso nuevo y restaurar las funciones fisiológicas pertinentes en un nivel celular o molecular.

OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es proporcionar armazones sin disolvente orgánico y que tienen una estructura tridimensional y una estructura anatómica externa, que se preparan mediante un procedimiento de fundido en caliente sin el uso de disolvente orgánico en base a los principios en compatibilidad molecular de biomateriales, usando un material de micropartículas compuesto hecho de una combinación de micropartículas de silicio, calcio y fósforo como la sustancia bioactiva de los armazones que podría inducir activamente la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos y promover la formación y calcificación de hueso nuevo, en combinación con un polímero orgánico en una proporción determinada como el vehículo, dicho material compuesto es bioactivo para inducir la regeneración de tejido óseo y tiene las propiedades físicas deseadas. Los armazones resultantes se pueden usar en ingeniería de tejido óseo humano de forma segura, económica y eficaz para reparar el defecto de tejido óseo provocado por un tumor, inflamación o herida o para operación ortopédica de hueso humano.

SUMARIO DE LA INVENCION

Para conseguir los objetos anteriores, un aspecto de la presente invención es proporcionar unos armazones compuestos para ingeniería de tejido óseo humano, que comprenden un polímero orgánico como vehículo con una estructura tridimensional que comprende microporos y canales de conexión o microporos, caracterizada por micropartículas que contienen los elementos inorgánicos silicón, calcio y fósforo como sustancia de inducción bioactiva, en la que el diámetro de las micropartículas es menor de o igual a 10 micrómetros.

Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un uso de micropartículas de elementos inorgánicos silicón, calcio y fósforo para la preparación de armazones para ingeniería de tejido óseo humano usados en la reparación regenerativa de defecto óseo y en la operación ortopédica.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Fig.1 Efectos de micropartículas de silicio, calcio y fósforo sobre la proliferación de osteoblastos, la bioactividad de fosfatasa alcalina, la síntesis y secreción de osteocalcina y la calcificación ósea en cuerpos humanos normales.

Fig.2 Comparación de funcionamientos de los armazones hechos de un material compuesto que comprende micropartículas de silicio, calcio y fósforo y polímero orgánico (PLGA) y los armazones hechos de material PLGA únicamente, en la inducción de proliferación de osteoblastos y la bioactividad de fosfatasa alcalina en cuerpo humano normal.

Fig.3 Armazones esféricos hechos de un material compuesto que comprende nanopartículas de silicio, calcio, fósforo y polímero orgánico (PLGA).

Fig.4 Fotos de SEM de microporos de los armazones hechos de un material compuesto que comprende nanopartículas de silicio, calcio, fósforo y polímero orgánico (PLGA).

Fig.5 Fotos de armazones cilíndricos que tienen una estructura tridimensional que consiste en microporos y canales de conexión, que están hechos de un material compuesto que comprende nanopartículas de silicio, calcio, fósforo y

polímero orgánico (PLGA) mediante el procedimiento de fundido en caliente.

Fig.6 El modelo animal para reconstruir el proceso condilar de articulación temporomandibular humana mediante ingeniería de tejidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención se basa en el estudio a largo plazo e intensivo del presente inventor, en busca de elementos de micropartículas útiles como los componentes químicos para preparar armazones para ingeniería de tejido óseo humano, dicho elemento de micropartículas es bioactivo para inducir la regeneración de tejido óseo humano, auto-degradable y puede neutralizar las sustancias ácidas o alcalinas alrededor de los armazones *in vivo*. Los presentes inventores desarrollaron inicialmente armazones para ingeniería de tejido óseo humano, en los que se usan micropartículas de silicio como el ingrediente activo principal para inducir la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos, formación ósea y calcificación; se usan micropartículas de calcio como un ingrediente activo para inducir de forma sinérgica la proliferación y diferenciación de osteoblastos; y se usan micropartículas de calcio y fósforo como ingredientes activos para inducir de forma sinérgica la calcificación de hueso regenerado. Estas combinaciones de elementos no tienen biotoxicidad, son activas para inducir la regeneración de tejido óseo y se pueden degradar *in vivo* y sustituirse con hueso nuevo. De esta forma, se evita el uso de productos de proteína en ingeniería de tejidos, el coste de producción se reduce y la seguridad y eficacia de los armazones en prácticas clínicas se aumentan. La combinación bioactiva de armazones de la presente invención difiere del biovidrio de armazones como se desvela en la Patente de los Estados Unidos 5977204 en que la combinación bioactiva de la presente invención comprende únicamente silicio o comprende silicio como el componente principal y una proporción determinada de calcio y/o fósforo, pero no tiene sodio. Adicionalmente, los diámetros de las partículas de los elementos en la presente invención son diferentes de los de la técnica anterior. Por lo tanto, la presente invención se refiere a la selección de sustancias químicas novedosas y proporciones de combinación de las mismas para regeneración de tejido óseo. La presente invención usa un polímero orgánico, tal como PLA, PGA o PLGA, como el vehículo para dichas micropartículas de silicio, calcio, fósforo, que conecta micropartículas de silicio, calcio y fósforo para el moldeo y proporciona resistencia a la presión a dichos armazones. Las micropartículas de silicio, calcio y fósforo en el material compuesto se usan como componentes bioactivos de dichos armazones y, por tanto, dichos armazones sirven como un depósito para dichos componentes bioactivos. Dichos componentes bioactivos se liberan desde los armazones de forma lenta, continua y uniforme cuando dicho polímero orgánico se degrada *in vivo*, para inducir la formación de hueso y para neutralizar los productos de descomposición ácidos de dicho polímero orgánico, proporcionando un entorno adecuado para la regeneración de tejido óseo. Por lo tanto, la presente invención aborda los problemas subyacentes en la técnica anterior de que los armazones para ingeniería de tejido óseo son deficientes en inducción biológica y no pueden usarse para reparar defectos de gran volumen de hueso.

En la presente invención, todos los elementos inorgánicos son micropartículas, que son diferentes de la Patente de los Estados Unidos 5977204 que se refiere a elementos en forma de partículas que tienen un diámetro de más de 50 micrómetros. A menos que se indique de otra manera, las "micropartículas" de la presente invención se definen como partículas que tienen un diámetro igual a o menor de 10 micrómetros, preferentemente como nanopartículas que tienen un diámetro menor de 1000 nm, más preferentemente menor de 100 nm y lo más preferente entre 5 y 80 nm. En el alcance de la presente invención, las micropartículas de silicio, calcio y fósforo que tienen un diámetro de más de 100 nm o más pequeño de 10 micrómetros también pueden usarse para conseguir el fin de la presente invención, ya que las mismas también tienen el efecto inductor biológico. Las únicas diferencias consisten en que tales micropartículas tienen un efecto inductor más débil debido a que las mismas se descomponen y difunden más lentamente. El diámetro de micropartículas como se usan en la presente invención es obviamente más pequeño de las que se usan en el material de armazones en la técnica anterior para ingeniería de tejido óseo. Además, el diámetro de micropartículas usadas en la presente invención favorece la distribución uniforme de elementos químicos en los armazones, la liberación uniforme de dichos elementos químicos desde los armazones y puede mejorar la resistencia a la presión de los armazones.

En la presente invención, a menos que se indique de otra manera, la "sustancia de inducción bioactiva" se define como una sustancia que puede estimular activamente a la célula normal a proliferar y diferenciarse específicamente de forma de conseguir una función fisiológica específica. Los elementos de silicio, calcio y fósforo de la presente invención son sustancias de inducción bioactivas que pueden inducir activamente a los osteoblastos humanos normales a proliferar y estimular series de funciones fisiológicas específicas (tales como la bioactividad de fosfatasa alcalina, la síntesis y secreción de osteocalcina y calcificación de hueso) de los osteoblastos. Todas las combinaciones de elementos inorgánicos en los armazones en la técnica anterior no tienen actividad inductora biológica similar a la que posee la combinación de la presente invención.

En la presente invención, a menos que se indique de otra manera, los "armazones para ingeniería de tejidos humanos" se definen como armazones que tienen estructuras tridimensionales específicas y formas consistentes con la morfología anatómica de la región de defecto en el hueso humano, que están hechos de un biomaterial que es tanto seguro como bioactivo y se puede absorber *in vivo* dentro de un período determinado. Cuando tales armazones se implantan *in vivo*, los mismos proporcionan una condición del entorno favorable para que los osteoblastos proliferen y se diferencien y promueven la formación gradual de hueso nuevo en los armazones, mientras que el material de la estructura de dichos armazones se absorbe gradualmente y finalmente

desaparece *in vivo* y la posición de dichos armazones se reemplaza con el hueso nuevo. Todos los armazones en la técnica anterior carecen de una estructura tridimensional específica similar a la de los armazones de la presente invención.

5 El inventor en primer lugar prueba y usa el elemento inorgánico "silicio" como la sustancia activa principal en armazones, que tiene un efecto inductor de forma bioactiva en la ingeniería de tejido óseo humano. Los datos experimentales de osteoblastos humanos normales como se muestra en la Fig.1 (véase más adelante) prueban que los iones de silicio añadidos en el medio de cultivo celular tienen efectos inductores y promotores significativos (2-4 veces) sobre los índices biológicos clave en la formación de hueso nuevo, tales como la proliferación de osteoblastos, la bioactividad de fosfatasa alcalina, la síntesis y secreción de osteocalcina y la calcificación de hueso, etc. Los datos en modelos animales como se muestra en la Fig.3 (véase más adelante) prueban además que, después de que las partículas del elemento inorgánico silicio se implantan *in vivo*, partículas de silicio inorgánico se difunden a los tejidos blandos circundantes e inducen el aumento de la concentración de ión azufre que marca la fase temprana (dos semanas) de la formación de hueso nuevo y también inducen el aumento de las concentraciones de iones calcio y fósforo que marcan la fase tardía (8 semanas) de la formación de hueso maduro y compacto. En base a estas evidencias, la presente invención en primer lugar consigue un avance importante, es decir, se afirma el efecto inductor biológico específico del elemento inorgánico silicio y el elemento silicio se puede usar en los armazones para ingeniería de tejido óseo. Adicionalmente, los datos de la Fig.1 muestran que la concentración de silicio es directamente proporcional al efecto inductor biológico del mismo y el efecto inductor máximo del silicio aparece en la concentración saturada de silicio (100 ppm).

20 Adicionalmente, los datos de experimentos como se muestra en la Fig.1 prueban que la combinación del elemento inorgánico silicio y los elementos inorgánicos calcio y fósforo obviamente tiene efecto sinérgico para promover la proliferación de osteoblastos humanos normales, la síntesis y secreción de osteocalcina y la calcificación de hueso. Por lo tanto, la presente invención usa los elementos inorgánicos calcio y fósforo como sustancias sinérgicas para ayudar a la bioactividad de iones de silicio.

25 En la presente invención, a menos que se indique de otra manera, todas las combinaciones de elemento usan ión silicio como la única o la sustancia inductora biológica principal y calcio y/o fósforo como sustancias activas de forma sinérgica, de forma de inducir activamente y eficazmente la formación de tejido óseo nuevo. Preferentemente, los porcentajes de contenidos atómicos en la "combinación de elementos usados como sustancia inductora biológica" son del 60-100% de silicio, el 0-30% de calcio y el 0-20% de fósforo; más preferentemente, el 60-90% de silicio, el 0-25% de calcio y el 0-15% de fósforo; y lo más preferente, el 60-70% de silicio, el 20-25% de calcio y el 10-15% de fósforo.

30 Las micropartículas de silicio/calcio/fósforo en dicho material compuesto bioactivo están en forma de una mezcla de todo tipo de micropartículas de elemento único o se obtienen mezclando todo tipo de elementos y moliendo en seco mediante procedimientos físicos o químicos convencionales. De acuerdo con la Fig.1, la cantidad relativa de los elementos atómicos en la mezcla de micropartícula o en las micropartículas de elementos compuestos no es un factor vital para conseguir el fin de la presente invención, debido a que diferentes proporciones atómicas o en peso solamente dan como resultado niveles diferentes de actividad inductora. Por lo tanto, todas las combinaciones con proporción atómica o en peso arbitraria de estos tres elementos, en las que se usa silicio como sustancia de inducción bioactiva principal y calcio y fósforo se usan como sustancias de inducción bioactivas de forma sinérgica, se pueden usar como sustancias bioactivas para los armazones de la presente invención.

35 Los elementos inorgánicos silicio, calcio y fósforo se definen como elementos bioactivos que pueden inducir la proliferación de tejido óseo humano, la diferenciación de osteoblastos y la calcificación de hueso. Esto también es un avance importante en el campo de biomateriales. En la técnica anterior, se considera que la osteogenina, auxina o conexina, etc. exógena sintetizada o extraída tienen efecto inductor biológico, pero estos productos biológicos tienen mala seguridad, estabilidad bioactiva inferior y coste elevado y por tanto difícilmente pueden usarse en bioingeniería. Además de las declaraciones anteriores, la actividad inductora de las combinaciones de elementos inorgánicos de la presente invención se comprueba además mediante la relación cercana entre la regeneración ósea y la distribución de ión silicio liberado en la interfaz entre el material implantado y el tejido como se muestra en el modelo animal de la Fig.3, la regeneración ósea-efecto inductor del material compuesto que comprende micropartículas de silicio/calcio/fósforo y PLGA el modelo de osteoblastos normales humanos como se muestra en la Fig. 2, así como los datos en el modelo animal como se muestra en la Fig.7. Por las razones indicadas anteriormente, en primer lugar se prueba que se pueden usar los elementos inorgánicos silicio, calcio y fósforo para reemplazar proteínas bioactivas y para conseguir un efecto inductor biológico significativo. Además, estos elementos inorgánicos se pueden usar como materiales bioactivos en los armazones para ingeniería de tejido óseo humano, de forma de obtener un material de armazones seguro y estable que se puede preparar fácilmente con menor coste y más seguridad y estabilidad y para mejorar la aplicabilidad práctica de los armazones.

40 En la técnica anterior, se usan comúnmente polímeros orgánicos (PLA, PGA y PLGA) como material de armazones único. Sin embargo estos polímeros orgánicos no tienen actividad inductora biológica y sus productos de degradación ácida en cuerpos humanos obstaculizan la regeneración de tejido óseo *in vivo*. En la presente invención, el polímero orgánico se usa solamente como un vehículo para la combinación específica de micropartículas de silicio, calcio y fósforo. De acuerdo con los resultados de ensayo de armazones que tienen

diferentes proporciones de vehículo, si el contenido de la combinación de los elementos inorgánicos es mayor del 80%, la resistencia a la presión de los armazones será relativamente más débil, por tanto no se puede mantener una estructura estérica específica en el cuerpo animal y si el contenido de la combinación de los elementos inorgánicos es menor del 20%, la actividad inductora biológica será insuficiente para promover la formación completa de hueso nuevo en 8 semanas. Para realizar un compromiso entre la resistencia a la presión y la bioactividad de los armazones, la presente invención define la proporción en volumen de la combinación de silicio/calcio/fósforo a polímero orgánico en un intervalo de 80:20 a 20:80, preferentemente de 70:30 a 30:70, de acuerdo con los ensayos biológicos de los ejemplos que se refieren a la Fig.2, Fig.4 y Fig.6. Dentro de este intervalo, la solubilidad del compuesto de los armazones se puede ajustar. Con el aumento del contenido de la combinación de silicio/calcio/fósforo, la bioactividad para inducir la regeneración de tejido óseo aumenta. Las cantidades de estos dos materiales se pueden ajustar dentro de este intervalo de forma de satisfacer los diferentes requerimientos para la reparación de tejido óseo humano. La presente invención usa una combinación de sustancias bioactivas y un polímero orgánico, que forman armazones que pueden servir como el depósito para tales sustancias bioactivas. Con la disolución del polímero orgánico (PLA, PGA, PLGA) *in vivo* (de 1 a 8 semanas), las micropartículas de silicio/calcio/fósforo se liberan de forma continua y estable para inducir la proliferación y diferenciación de osteoblastos y la formación y calcificación de hueso durante el procedimiento completo de regeneración ósea. Adicionalmente, las nanopartículas de silicio/calcio/fósforo liberadas pueden neutralizar los productos de degradación ácida del polímero orgánico, dando como resultado un entorno local que rodea los armazones provechoso para la regeneración de tejido óseo.

En la técnica anterior, todos los fosfato de calcio o biovidrios para la reparación de defectos óseos son partículas grandes que tienen un diámetro mayor de 50 micrómetros. Si tales partículas grandes se usan en el material compuesto, las propiedades físicas de dicho material compuesto se afectarán. Además, la liberación de partículas grandes incrustadas en el polímero orgánico de los armazones no es uniforme. Por lo tanto, la presente invención usa micropartículas de silicio/calcio/fósforo que tienen un diámetro menor de o igual a 10 micrómetros, preferentemente menor de 1000 nm, más preferentemente menor de 100 nm y lo más preferente en el intervalo de 5-80 nm, de forma que dichas micropartículas se incrustan uniformemente en el polímero orgánico y se liberan lentamente y uniformemente durante la degradación de dicho polímero orgánico. Las micropartículas se preparan mezclando micropartículas de cada uno de los tres elementos de acuerdo con los contenidos atómicos como se define en la presente invención.

En la técnica anterior, la estructura tridimensional de diversos armazones es microporosa con diámetro de poro uniforme y distribución uniforme. La desventaja de estos armazones consiste en que los microporos relativamente más pequeños (que tienen un diámetro menor de 300 micrómetros) son desfavorables para la entrada de osteoblastos y vasos sanguíneos y los microporos relativamente grandes (que tienen un diámetro mayor de 400 micrómetros) son desfavorables para la regeneración de tejido óseo. Es decir, la aplicación práctica de estos armazones en la bioingeniería ósea está obviamente limitada. La presente invención usa armazones que tienen una estructura tridimensional que comprende tanto microporos como canales de conexión como se muestra en la Fig.6 (véase más adelante). De acuerdo con los resultados de ensayo para otros diámetros, los poros con un diámetro de menos de 100 micrómetros no son adecuados para la entrada de las células y los poros con un diámetro de más de 300 micrómetros no son adecuados para la formación de hueso nuevo. De forma que todos los armazones usados en los Ejemplos de preparación y ensayos biológicos como se muestran en las Fig.4 a Fig.7 (véase más adelante) tienen microporos con un diámetro que varía de 100 a 300 micrómetros. Los microporos con un diámetro como se define en la presente invención son adecuados para la proliferación de osteoblastos y regeneración de hueso nuevo. La ocupación de microporos de la presente invención es del 50% al 90%. Por ejemplo, la ocupación de microporos de armazones usados en los Ejemplos como se muestra en la Fig.4, Fig.6 y Fig.7 es del 80%, el 50% y el 50%, respectivamente. De acuerdo con los resultados de ensayo para otra ocupación de microporos, la resistencia física a la presión de armazones con una ocupación de microporos de más del 90% es obviamente más débil e insuficiente para resistir la presión de tejidos circundantes, mientras que los osteoblastos difícilmente pueden entrar a los armazones para formar hueso nuevo si la ocupación de microporos es menor del 50%. De acuerdo con los resultados de ensayo sobre diferentes diámetros de canales de conexión, si el diámetro es mayor de 500 micrómetros, la resistencia a la presión de los armazones es obviamente más débil y la neogénesis de tejido óseo de gran volumen se obstaculiza, mientras que la entrada de células y la formación de tejido óseo están obstaculizadas cuando el diámetro es menor de 350 micrómetros. Por lo tanto, el diámetro de los canales de conexión de la presente invención está en un intervalo de 350 a 500 micrómetros, para asegurar la entrada de células a la región profunda de los armazones y el suministro de nutrientes y oxígeno al hueso nuevo a través de nuevos vasos sanguíneos que crecen a lo largo de dichos canales de conexión dentro de los armazones. De acuerdo con los resultados de ensayo sobre los intervalos entre los canales de conexión, la resistencia a la presión de los armazones es más débil cuando el intervalo es menor de 3 mm, mientras la entrada de células a todos los microporos de los armazones para la formación de hueso nuevo se obstaculiza cuando el intervalo es mayor de 6 mm, inadecuado por tanto para la formación de hueso nuevo. Por lo tanto, el intervalo entre canales de conexión de la presente invención está preferentemente en un rango de 3 a 6 mm, de forma de asegurar la entrada uniforme de células en todos los microporos a través de los canales de conexión. La presente invención usa unidades combinadas con una estructura tridimensional que comprende tanto canales de conexión como microporos dispuestos de forma concéntrica, que se pueden agregar de forma repetitiva (como componentes básicos) para formar diversos armazones de un volumen mayor para la reparación de defecto óseo grande. Esta estructura

tridimensional novedosa comprende microporos que son beneficiosos para la regeneración de hueso y canales de que son beneficiosos para la distribución uniforme de células, la transmisión de nutrientes para tejidos humanos y la regeneración de vasos sanguíneos en el hueso nuevo y por tanto se puede usar para reparar a defecto óseo de gran volumen que no se podía reparar en la técnica anterior. Con respecto a armazones de tamaño pequeño que tienen un tamaño menor de 5 mm o diversos defectos óseos que tienen restos escleróticos del paciente, se pueden usar armazones que tienen únicamente microporos y diversas formas, tales como forma esférica, forma cilíndrica o forma cuadrada como se muestra en la Fig.4 y Fig.6, de acuerdo con la presente invención.

La forma de anatomía de los armazones de la presente invención para ingeniería de tejido óseo humano se puede dividir en dos grupos, concretamente tipo prefabricado y tipo hecho a la medida, dependiendo de la posición y tamaño del defecto óseo. Los armazones prefabricados pueden ser de diversas formas, tales como forma esférica, forma cilíndrica o forma cuadrada, etc. Cuando el diámetro de los armazones prefabricados es menor de 5 mm, únicamente habrá microporos en los armazones, sin canales de conexión. Estos armazones de tamaño pequeño pueden ser de diversos diámetros que varían desde 0,5 mm hasta 5 mm. Los armazones prefabricados que tienen un tamaño mayor de 5 mm se diseñan como un agregado de unidades combinadas que comprenden tanto microporos como canales de conexión con diferentes tamaños y formas, de forma de llenar el espacio del defecto óseo hasta un alcance máximo. Los armazones prefabricados se usan para llenar regiones de defecto óseo de diferente tamaño y forma y en diferentes emplazamientos en el cuerpo humano para la regeneración de tejido óseo. Los armazones hechos a medida usan la imagen de exploración de hueso humano como molde para diseñar la forma de los armazones que se ajuste a la morfología anatómica del hueso humano y los armazones tienen una estructura combinada que comprende tanto microporos como canales de conexión, que se pueden usar para reparar un defecto óseo grande, para operación ortopédica de hueso humano y para tratamiento del caso sin pared ósea residual para mantener la forma.

Adicionalmente, habitualmente se usan disolventes orgánicos en la técnica anterior para preparar armazones de polímero orgánico para bioingeniería. Como los disolventes orgánicos difícilmente se pueden retirar completamente de los armazones, es dañino para la regeneración de tejido óseo humano. A diferencia del procedimiento para preparar los armazones para ingeniería de tejido óseo humano conocidos en la técnica anterior, el procedimiento de la presente invención usa un procedimiento convencional de fundido en caliente para preparar los armazones prefabricados o hechos a medida para bioingeniería, que evita el uso de disolventes orgánicos. El procedimiento de la presente invención puede evitar la citotoxicidad provocada por el disolvente orgánico residual en los armazones de la técnica anterior y puede reducir el coste de la producción en lote de los armazones.

El uso clínico de los armazones de la presente invención para ingeniería de tejido óseo humano comprende implante de células *in situ in vivo* o implante de las células proliferadas *in vitro*. El implante de células *in situ in vivo* comprende implantar directamente armazones prefabricados de tamaño pequeño en la cavidad del defecto del hueso humano durante la cirugía, usando directamente la célula intersticial no diferenciada con alto contenido en la sangre y el exudado tisular inmovilizado en la cavidad del defecto óseo durante la cirugía para infiltrar en el espacio entre los poros de los armazones e inducir la regeneración de hueso por el material del armazón. Por tanto se puede usar un procedimiento de este tipo para reparar el defecto de hueso en un emplazamiento sin tensiones con pared exterior residual de hueso. Los armazones prefabricados implantados son una combinación de armazones, con un tamaño de más de 0,5 mm. Por ejemplo, los armazones esféricos y cilíndricos como se muestra en la Fig.4 y Fig.6 se usan en los procedimientos mencionados anteriormente. El implante de las células proliferadas *in vitro* se usa para reparar defectos óseos en un emplazamiento sometido a tensión o en un emplazamiento sin pared exterior residual de hueso. La fuente de osteoblastos autólogos humanos normales, los cuales son necesarios en grandes cantidades para reparar un defecto óseo de volumen grande mediante el implante de los mismos en armazones, siempre es un problema grave en el campo médico. El implante de osteoblastos autólogos proliferados *in vitro* a partir de ser humano normal como se emplea en la presente invención puede resolver este problema. La presente invención usa un fragmento esquelético autólogo superficial obtenido de un paciente como la fuente de osteoblastos. Un fragmento esquelético superficial de 0,2 cm³ puede proliferar *in vitro* para producir 6-10 millones células de osteoblasto autólogo que tienen actividad de osteogénesis normal como se muestra en la Fig.7. Además, esto no deja cicatriz, ni tiene influencias funcionales ni físicas en el sitio de recolección. 55 millones de células de osteoblasto proliferadas son suficientes para suministrar los armazones para regeneración de un hueso autólogo normal de 2 cm³. En la práctica clínica, los armazones hechos a medida se incrustan en una región de defecto óseo después que las células de osteoblasto proliferadas se implantan en dichos armazones *in vitro* y el hueso se fija con férulas de soporte de aleación mediante operación ósea normal. Con la regeneración de hueso nuevo en los armazones, la fuerza de soporte de dichas férulas se reduce de forma gradual, la carga del hueso nuevo se aumenta gradualmente y finalmente las funciones fisiológicas del hueso regenerado se restauran (véase más adelante, "El modelo animal para reconstruir el proceso condilar de articulación temporomandibular humana mediante ingeniería de tejidos").

En comparación con la técnica anterior, los méritos de la presente invención consisten en que: el uso de micropartículas de silicio/calcio/fósforo que tienen actividad inductora sobre la regeneración ósea humana como material bioactivo hace que la eficacia biológica de los armazones de la presente invención sea significativamente mejor que los armazones conocidos en la técnica anterior sin actividad inductora biológica; el uso de unidades de combinación que comprenden tanto microporos como canales de conexión en los armazones promueve la distribución uniforme de células humanas y la regeneración de vasos sanguíneos en los armazones, resolviendo el

problema de que el hueso regenerado está limitado únicamente en una región local que rodea los almacenes en la técnica anterior. Además, la reparación y regeneración de defecto óseo humano grande que no se pueden conseguir en la técnica anterior ahora se pueden conseguir en la presente invención agregando de forma repetitiva las unidades de combinación de almacenes con estructura coincidente de forma tridimensional para formar un volumen suficiente.

La presente invención además se ilustra con los siguientes Ejemplos no limitantes en combinación con las Figuras.

Ejemplo 1. Las micropartículas de silicio, calcio, fósforo inducen biológicamente la proliferación de osteoblastos, la bioactividad de fosfatasa alcalina, la síntesis y secreción de osteocalcina y la calcificación ósea en cuerpo humano normal de forma significativa

Las células de osteoblasto humanas usadas en el ensayo se obtienen de donantes sanos con edades de 20 a 25 años de edad. Cada uno de los grupos de células se obtiene a partir de fragmentos esqueléticos superficiales de 0,2 cm³ de un donante. Existen en total 5 grupos de células usados en el ensayo. Los valores medios y desviaciones típicas de los datos de ensayo para 5 grupos se muestran en la Fig.1. Se puede observar que un fragmento esquelético superficial de 0,2 cm³ de donantes puede proliferar hasta producir 6-10 millones de células de osteoblasto autólogo que tienen actividad de osteogénesis en laboratorio. A los medios de cultivo celular usados en el ensayo se añaden previamente las partículas de silicio, calcio, fósforo que tienen un diámetro de menos de 10 micrómetros a concentraciones o proporciones específicas como se muestra más adelante en las tablas de la Fig.1, siendo la concentración de saturación del silicio 100 ppm. Durante el cultivo, el medio de cultivo con concentraciones específicas de las partículas se reemplaza con medios nuevos que comprenden las partículas en las mismas concentraciones cada 3 días. El día 12 y el día 20, se llevan a cabo los siguientes ensayos: 1) el ensayo de la proliferación de osteoblastos: recuento del número total células que están creciendo en los medios de cultivo con diferentes concentraciones o proporciones de aditivos químicos mediante una máquina de recuento de flujo celular convencional y cálculo del múltiplo de proliferación de osteoblastos como se muestra en la Fig.1 en base al número de células adheridas en la placa de cultivo en las primeras 24 horas, lo que demuestra que el elemento inorgánico silicio tiene un efecto inductor obvio sobre la proliferación de osteoblastos y el efecto inductor es directamente proporcional a la concentración de silicio. Además, los elementos inorgánicos calcio y fósforo mejoran el efecto inductor biológico del silicio de forma sinérgica; 2) determinar la bioactividad de fosfatasa alcalina. Una característica importante de los osteoblastos normales es la secreción de fosfatasa alcalina con función normal. Se ensayan las células cultivadas en las condiciones como se muestra más adelante en las tablas de la Fig.1 durante 12 días y 20 días; las células se desprenden mediante plasmata, se alteran con un generador ultrasónico convencional y la suspensión de células resultante se analiza con cromatografía convencional; después se calcula el número de microequivalentes del sustrato que se degradan mediante la fosfatasa alcalina producida por 10 millones de células por hora. Los resultados han demostrado que el elemento inorgánico silicio puede mejorar la bioactividad y los efectos inductores de fosfatasa alcalina de forma proporcional a la concentración de silicio; 3) determinar la síntesis y secreción de osteocalcina. La síntesis y secreción de osteocalcina es un índice específico e importante de la actividad de osteoblastos humanos normales. El contenido de osteocalcina secretado en el medio de cultivo se determina mediante un procedimiento inmunohistoquímico convencional usando un anticuerpo monoclonal frente a osteocalcina humana. Los resultados se expresan como valores de femtogram de osteocalcina secretados por 10 millones de células el día 12 y el día 20. Los resultados demostraron que el elemento inorgánico silicio pudo inducir de forma significativa el aumento de la secreción de osteocalcina por los osteoblastos humanos normales. Tal efecto inductor es directamente proporcional a la concentración de silicio. Además, los elementos inorgánicos calcio y fósforo funcionaron de forma sinérgica para ayudar al efecto inductor biológico del silicio. Y 4) ensayo de calcificación ósea. El depósito de calcio en el intersticio de osteoblastos es uno de los índices importantes durante la fase final de formación de hueso nuevo. Las células de cada grupo se tiñeron para calcio mediante procedimientos convencionales el día 12 y día 20 y la densidad de tinción se determinó mediante un instrumento cromatográfico convencional. Los resultados probaron que las concentraciones más elevadas de silicio, calcio y fósforo funcionaron de forma significativa y de forma sinérgica para inducir y aumentar la calcificación de osteoblastos humanos normales.

Ejemplo 2. El material compuesto que comprende micropartículas de silicio, calcio, fósforo y polímero orgánico (PLGA), es ventajoso sobre el material únicamente de PLGA para inducir la proliferación de osteoblastos humanos normales y la bioactividad de fosfatasa alcalina

Este ensayo biológico ilustra el efecto inductor de un grupo de materiales compuestos nanométricos de la presente invención en cultivo celular *in vitro* y hace una comparación con las placas de cultivo celular con únicamente polímero orgánico PLGA y poliestireno convencional. Los contenidos atómicos de elementos inorgánicos en la combinación de elementos del material compuesto son el 67% de silicio, el 22% de calcio y el 11% de fósforo y la proporción en volumen de la combinación de elementos inorgánicos a PLGA es 50:50. Este material compuesto y el polímero orgánico único PLGA se procesan por separado para formar discos con un diámetro de 2 cm y un espesor de 1,5 mm mediante el procedimiento de fundido en caliente con un molde a 200°C durante 8 horas (véase también el ejemplo 4 para las etapas detalladas). Los discos obtenidos se colocan por separado en placas de cultivo celular de poliestireno convencionales con un diámetro de 2 cm, las células se inoculan en discos moldeados diferentes o directamente en las placas de cultivo celular de poliestireno convencionales sin un disco moldeado y

5 después se determinan los efectos de diferentes materiales sobre las células cultivadas. Los tres grupos de células de ensayo se obtienen de tres donantes sanos. La proliferación de células y la bioactividad de fosfatasa alcalina se determinan mediante los procedimientos indicados en la Fig.1 después de que dichas células se cultivan durante 7 días. Los datos como se muestran en la Fig.2 son valores medios y desviaciones típicas de estos tres grupos de células. Los resultados prueban que el disco hecho del material compuesto de la presente invención tiene un efecto inductor biológico mejor que el del disco con PLGA únicamente y que la placa de cultivo celular de poliestireno convencional.

Ejemplo 3. La difusión y distribución de iones de silicio después de que el material nanométrico de silicio se implanta en un modelo animal y la distribución iónica para inducir la regeneración de tejido óseo nuevo

10 Se usan conejos blancos adultos como modelo animal en el presente ensayo biológico. Se realiza una cavidad ósea con un diámetro de 0,5 cm en la fíbula del modelo animal mediante un punzón recto, después las partículas de material compuesto de silicio/calcio/fósforo (proporción atómica de Si:Ca:P = 67:22:11) que tienen un diámetro de 50-80 nm se rellenan en dicha cavidad, finalmente la herida se sutura. Los animales de ensayo se alimentan durante 2 u 8 semanas y después la parte rellena con el material compuesto y los tejidos circundantes se retiran mediante una segunda cirugía, que se fijan con formaldehído al 10%, se incrustan con resina, se cortan como trozos de 1 mm a lo largo de la sección longitudinal y finalmente las distribuciones de concentración de iones a los dos lados de la interfaz entre la región rellena con el material compuesto y el tejido animal circundante se determinan mediante un analizador de iones de radiación. Los datos mostrados en la Tabla 1 son valores medios de 5 grupos de animales en porcentaje atómico.

Tabla 1. Distribución de concentración de silicio, calcio, fósforo, azufre y cloro en la interfaz entre el organismo y el material implantado

	Dos semanas		La interfaz entre el material y el cuerpo animal	Lado del cuerpo animal	
	+1 mm ←	lado del material		+ 1 mm	+ 2 mm
Silicio	14,78	4,12	8,79	13,92	2,09
Calcio	28,37	8,70	9,01	14,47	9,47
Fósforo	7,31	7,88	8,47	11,64	18,51
Azufre	7,81	24,26	11,88	15,47	31,90
Cloro	24,99	0	0	0	0
Ocho semanas				Lado de cuerpo animal →	
	← lado de material				
Silicio	12,72	21,22	0,41	0,58	0,29
Calcio	56,64	37,96	64,63	59,93	59,44
Fósforo	17,76	34,45	32,40	35,95	37,96
Azufre	0	0	0	0	0
Cloro	0	0	0	0	0

Los resultados muestran que los iones de silicio se liberan a partir de nanopartículas de silicio y se difunden en los cuerpos animales después de que el material compuesto se implanta en el cuerpo animal durante dos semanas, dando como resultado un aumento local significativo de la concentración de ión silicio así como el aumento de la concentración de ión azufre que indica la regeneración activa de hueso nuevo en una fase temprana. Después de 8 semanas, los iones de silicio desaparecen en el cuerpo animal y las concentraciones de calcio y fósforo que indican la formación de hueso maduro aumentan de forma significativa. Este modelo de ensayo biológico también se ensaya histológicamente y los resultados prueban que las imágenes de tejido a los dos lados de la interfaz cumplen con los cambios dinámicos de la formación de hueso nuevo marcada por los cambios de distribución de iones mencionados anteriormente. Los resultados de este ensayo biológico prueban que el ión silicio tiene un efecto bioactivo clave sobre la inducción de formación de hueso nuevo.

Ejemplo 4. Armazones esféricos hechos de un material compuesto que comprenden nanopartículas de silicio, calcio, fósforo y polímero orgánico (PLGA) mediante procedimiento de fundido en caliente

Este es un ejemplo de preparación de unos armazones esféricos hechos de material compuesto. Los materiales de partida son sílice (SiO_2), óxido de calcio (CaO) y trifosfato de calcio ($\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$), en el que los contenidos atómicos son el 67% de silicio, el 22% de calcio y el 11% de fósforo, respectivamente y las proporciones en peso de los materiales de partida son el 40% de sílice, el 6% de óxido de calcio y el 54% de trifosfato de calcio de forma correspondiente. El procedimiento de preparación comprende mezclar los materiales de partida inorgánicos que contienen silicio-, calcio- y fósforo- mencionados anteriormente de acuerdo con dichas proporciones en peso, molienda mediante un molino Retsch track auto-rolling durante 3 días hasta que el diámetro de las micropartículas alcance un intervalo de 5 a 80 nm. El diámetro de las micropartículas se afirma mediante microscopio de exploración electrónico. El polímero orgánico PLGA se muele mediante un molino de trituración eléctrico de acero inoxidable y se tamiza con un tamiz fino para obtener micropartículas de PLGA con un diámetro que varía de 25 a 50 micrómetros. Los armazones esféricos como se muestran en la Fig.3 se preparan con la combinación de elementos inorgánicos y PLGA en una proporción de 70:30. Se fabrica un molde a partir de politetrafluoroetileno; después las micropartículas de material de partida inorgánico que contienen silicio-, calcio-, fósforo- y las micropartículas de polímero orgánico se rellenan en el molde en la proporción mencionada anteriormente. Después de llenarlo, el molde se sinteriza a 200°C durante 8 horas en un vaso de precipitado cerámico, se enfría gradualmente (10°C por minuto) y finalmente extrae del molde para obtener los armazones esféricos como se muestran en la Figura 3 (la ocupación de microporos es el 80%; y el diámetro de los microporos es de 100 a 300 micrómetros).

Ejemplo 5. Las imágenes de microscopio de exploración electrónico indican los microporos en los armazones hechos del material compuesto que comprenden nanopartículas de silicio, calcio, fósforo y el polímero orgánico (PLGA)

Los armazones obtenidos hechos del material compuesto que comprende nanopartículas de silicio, calcio, fósforo y el polímero orgánico (PLGA) se corta a lo largo de su sección longitudinal y sus microporos internos se inspeccionan mediante un microscopio de exploración electrónico convencional. El resultado como se muestra en la Fig.4 prueba que los armazones preparados mediante el procedimiento de fundido en caliente tienen una estructura con microporos consecutivos (el diámetro de dichos microporos varía de 100 a 300 micrómetros).

Ejemplo 6. Los armazones cilíndricos hechos del material compuesto que comprende nanopartículas de silicio, calcio, fósforo y polímero orgánico (PLGA) mediante el procedimiento de fundido en caliente tienen una estructura tridimensional que comprende tanto microporos como canales de conexión que conectan dichos microporos

Este es un ejemplo para la preparación de armazones cilíndricos hechos de un material compuesto. Los materiales de partida son sílice (SiO_2), óxido de calcio (CaO) y trifosfato de calcio ($\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$), en el que los contenidos atómicos son el 67% de silicio, el 22% de calcio y el 11% de fósforo respectivamente y las proporciones en peso de los materiales de partida son el 40% de sílice, el 6% de óxido de calcio y el 54% de trifosfato de calcio de forma correspondiente. El procedimiento de preparación comprende El procedimiento de preparación comprende mezclar los materiales de partida inorgánicos que contienen silicio-, calcio- y fósforo- mencionados anteriormente en dichas proporciones en peso, molienda mediante un molino Retsch track auto-rolling durante 3 días hasta que el diámetro de las micropartículas alcance un intervalo de 5 a 80 nm. El diámetro de las micropartículas se afirma mediante microscopio de exploración electrónico. El polímero orgánico PLGA se muele mediante un molino de trituración eléctrico de acero inoxidable y se tamiza con un tamiz fino para obtener micropartículas de PLGA con un diámetro que varía de 25 a 50 micrómetros. Los armazones cilíndricos como se muestran en la Fig.6 se preparan a partir de la combinación de elementos inorgánicos y PLGA en una proporción de 50:50 de la manera siguiente. Se prepara el molde a partir de politetrafluoroetileno; y después varios cables de acero inoxidable con un diámetro de 350-500 micrómetros y un intervalo de 4 mm se instalan en dicho molde en la orientación diseñada. Los materiales de partida mencionados anteriormente se rellenan en el molde, se sinterizan a 200°C durante 8 horas en un vaso de precipitado cerámico, se enfría gradualmente (10°C por minuto) y después se extrae del molde. Después de retirar los armazones cilíndricos, los cables de acero inoxidable se extraen, dando como resultado los armazones cilíndricos como se muestran en la Figura 5 (la ocupación de microporos es el 50%; el diámetro de microporos es de 100 a 300 micrómetros; y el diámetro de los canales de conexión es 500 micrómetros).

Ejemplo 7. El modelo animal para reconstruir el proceso condilar de articulación temporomandibular humana mediante ingeniería de tejidos

5 Como se muestra en la Fig.6a, se prepara un molde de politetrafluoroetileno de acuerdo con la forma anatómica del proceso condilar de la articulación temporomandibular humana y los armazones hechos a medida se preparan de acuerdo con el procedimiento para preparación de armazones mostrado en la Fig.5. Como se muestra en la Fig.6b, los fragmentos esqueléticos superficiales se recogen de la parte superficial de un paciente a través de las siguientes etapas: incisión del tejido blando en una posición escondida de superficie corporal bajo anestesia local, raspado de aproximadamente 0,2 cm³ de fragmentos esqueléticos superficiales y cultivo en medio de cultivo celular. La incisión se sutura. La misma sana de 3 a 5 días y no existe efecto sobre la función o el estado del paciente. El fragmento esquelético obtenido se coloca en un aplaca de cultivo de poliestireno convencional en una cámara de cultivo celular y se cultiva a 37°C. Después de 2 semanas, 6 a 10 millones de osteoblastos autólogos con actividad de osteogénesis normal como se muestra en la Fig.6b proliferarán a partir de los fragmentos esqueléticos superficiales de 0,2 cm³. La Fig.6b indica los resultados positivos del ensayo de depósito de calcio mediante un procedimiento "Vancusa" convencional, en el que las partículas marrones en la zona de acumulación de células óseas teñidas de rosa son evidencias de calcificación ósea. Por las razones proporcionadas anteriormente, estas células proliferadas se pueden usar en armazones para prácticas médicas. De acuerdo con las prácticas médicas, 5 millones de células son suficientes para armazones para regenerar y formar un hueso autólogo normal de 2 cm³. Las etapas pertinentes comprenden desprender las células proliferadas mediante plasmata de la placa de cultivo, sumergir los armazones en la solución de células de forma que las células entren a las partes de armazones a través de los canales de conexión y los microporos conectados de los armazones. Los armazones con células en los mismos se implantan en el cuerpo de un modelo animal para ensayo (véase la Fig.6c) mediante una cirugía convencional. En las prácticas clínicas, los armazones implantados en el cuerpo se fijan con férulas de aleación mediante una cirugía ósea convencional. Con la regeneración de hueso nuevo en los armazones, la fuerza de soporte de las férulas de fijación se reduce gradualmente, la carga del hueso nuevo se aumenta gradualmente y finalmente las funciones fisiológicas del hueso regenerado se restauran. Como se muestra en la Fig.6d, se forman tejidos óseos nuevos después de que las células y los armazones se implantan en el cuerpo durante 6 semanas. Por ejemplo, el hueso nuevo de este modelo animal se ensaya extrayendo los armazones implantados mediante cirugía, fijándolo con solución de formaldehído al 10% durante 24 horas, se impregna con cera de parafina, cortando y tiñendo el tejido mediante un procedimiento convencional. El hueso humano normal formado recientemente se puede observar bajo microscopio óptico normal y la aparición de túbulos de Harvard prueba la formación de hueso de alta densidad. Mientras tanto, se observan vasos sanguíneos generados recientemente en la posición de los canales de conexión originales en armazones. Estas evidencias histológicas prueban que la neogénesis del tejido óseo normal es satisfactoria.

Documentos de Referencia:

1. Barrera DA, Zylstra E, Lansbury PT, Langer R. (1995), Copolymerization and degradation of poly(lactic acid-co-llysine), *Macromolecules*, 28: 425-432.
- 35 2. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upto J, Vacanti CA. (1997), Transplantation of chondrocytes utilizing a polymercell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear, *Plast. Reconstr. Surg.* 100: 297-304.
3. Cartner LP, Hiatt JL. (1997), *Textbook of Histology*, V.B. Saunders Company, Filadelfia.
4. Chou L, Firth JD, Uitto V-J, Brunette DM. (1995), Substratum surface topograph alters cell shape and regulates fibronectin, mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts, *J. Cell Sci.* 108: 1563-1573.
- 40 5. Chou L, Firth JD, Nathanson D, Uitto V-J, Brunette DM, (1996) Effects of titanium on transcriptional and posttranscriptional regulation of fibronectin in human fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 31: 209-217.
6. Chou L, Firth JD, Uitto V-J, Brunette DM. (1998a), Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 39: 437-445.
- 45 7. Chou L, Marek B, Wagner WR. (1999) Effects of hydroxyapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency, and proliferation in vitro. *Biomaterials*, 20:977-985.
8. Feinberg SE, Holloster SJ, Halloran JW, Chu TMG, Krebsbach PH. (2000) tissue engineering approach to sitespecific reconstruction of skeletal structures of the maxillofacial regions. *Shanghai Journal of Stomatology.* 9:34-38; 88-93.
- 50 9. Gauthier AJ, Ducheyne P, Bettiger D. (1999) Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesión of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J. Biomed. Mat. Res.* 40: 48-56.
10. Hubbell JA. (1995) *Biomaterials in tissue engineering.* *Bio/Technology.* 13(6): 565-576.
11. KuKubo T, ITO S, Shigematsu M, Sakka S, Yamamuro T. (1985) Mechanical properties of a new type of apatite-containing glass ceramics for prosthetic application. *J. Mater. Science*, 20: 2001-2004.

12. Minuth WW, Sittinger M, Kloth S. (1998) Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Research*. 291(1): 1-11.
13. Pachence JM, Kohn J. (1997) Biodegradable polymers for tissue engineering, in *Principles in Tissue Engineering*. Por Lanz RP, Langer R, Chick WL. Academic Press, Londres. Págs. 273-293.
- 5 14. Thomson RC, Yaszemski MJ, Mikos AG. (1997) Polymer scaffolds processing. In *Principles in Tissue Engineering*. Por Lanz RP, Langer R, Chick WL. Academic Press, Londres. Págs. 263-272.
15. Tsuruga E, Hiroko T, Hideaki I, Yuichi W, Yoshinori K. (1997) Pore size of porous hydroxyapatite as the cell substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem*. 121: 317-324.
- 10 16. Ugo R, Reddi AH. (1997) Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissue by bone morphogenetic proteins. 8: 154-163.
17. Wong Yulai, Cao Yilin, Vacanti, (2000) Experimental studies on condyle of human temporomandibular joint by tissue engineering, *Shanghai Journal of Stomatology*. Vol.9(2): 94-96.
18. Patente de los Estados Unidos 4103002, julio de 1978
19. Patente de los Estados Unidos 4192021, marzo de 1980
- 15 20. Patente de los Estados Unidos 5017627, mayo de 1991
21. Patente de los Estados Unidos 5552454, septiembre de 1996
22. Patente de los Estados Unidos 5977204, noviembre de 1999
23. Patente de los Estados Unidos 6051247, abril de 2000

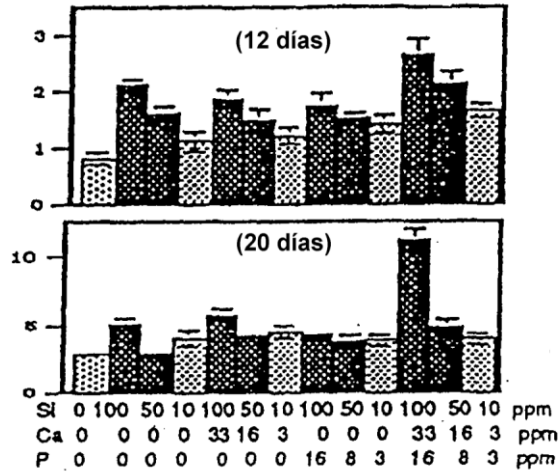
REIVINDICACIONES

1. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano con una estructura tridimensional que comprende microporos y canales de conexión o microporos que comprenden un polímero orgánico como vehículo **caracterizados por** micropartículas que contienen elementos inorgánicos silicio, calcio y fósforo como sustancia de inducción bioactiva, en los que el diámetro de las micropartículas es menor de o igual a 10 micrómetros.
- 5 2. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 1, en los que las micropartículas son una mezcla de micropartículas de silicio, micropartículas de calcio y micropartículas de fósforo o son micropartículas de una mezcla de elementos de silicio, calcio y fósforo.
3. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el diámetro de las micropartículas es menor de 1000 nm.
- 10 4. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 3, en los que el diámetro de las micropartículas, es menor de 100 nm.
5. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 4, en los que el diámetro de las micropartículas es de 5 a 80 nm.
- 15 6. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en los que los contenidos atómicos de los elementos inorgánicos en las micropartículas son del 60-100% de silicio, menos del 30% de calcio y menos del 20% de fósforo.
7. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 6, en los que los contenidos atómicos de los elementos inorgánicos en las micropartículas son del 60-90% de silicio, menos del 25% de calcio y menos del 15% de fósforo.
- 20 8. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 7, en los que los contenidos atómicos de los elementos inorgánicos en las micropartículas son del 60-70% de silicio, del 20-25% de calcio y del 10-15% de fósforo.
9. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el polímero orgánico como vehículo se selecciona entre el grupo que consiste en ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) o compuesto (PLGA) de PLA y PGA.
- 25 10. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 9, en los que la proporción en volumen de las micropartículas como componentes activos al polímero orgánico como vehículo es de 80% : 20% a 20% : 80%.
- 30 11. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 10, en los que la proporción en volumen de las micropartículas es de 70% : 30% a 30% : 70%.
12. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el diámetro de los microporos es de 100 a 300 micrómetros.
13. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 1, en los que la ocupación de los microporos es del 50% al 90%.
- 35 14. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el diámetro de los canales de conexión es de 350 a 500 micrómetros.
15. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 1, en los que el intervalo entre canales de conexión es de 3 a 6 mm.
- 40 16. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 1, en los que los canales de conexión y los microporos concéntricos forman unidades de estructura combinada.
17. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en los que los armazones están en una forma prefabricada o una forma hecha a medida para ajustarse a la morfología anatómica.
- 45 18. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 17, en los que la forma prefabricada de armazones tiene una forma seleccionada entre el grupo que consiste en forma esférica, forma cilíndrica y forma cuadrada, cuando el diámetro de la forma prefabricada de armazón es menor de 5 mm y el diámetro de los microporos varía en un intervalo de 0,5 mm a 5 mm, mientras que la forma prefabricada de armazón que tiene a tamaño mayor de 5 mm es una agregación de unidades combinadas que comprende tanto microporos como canales de conexión.

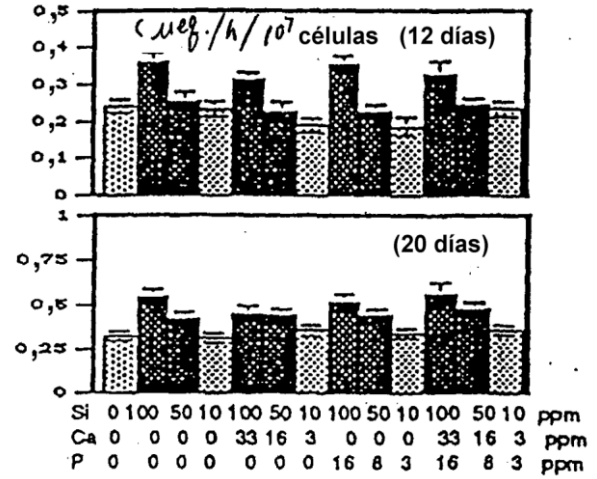
19. Armazones para ingeniería de tejido óseo humano de acuerdo con la reivindicación 17, en los que el armazón hecho a medida tiene una forma diseñada de acuerdo con la morfología anatómica del defecto óseo humano como molde y es un agregado de armazones de volumen grande con unidades de estructura de ensamblaje que comprenden tanto canales de conexión como microporos concéntricos.
- 5 20. Uso de micropartículas de elementos inorgánicos de silicona, calcio y fósforo para la preparación de armazones de acuerdo con la reivindicación 1 para ingeniería de tejido óseo humano usados en la reparación regenerativa de defecto óseo y en la operación ortopédica.

FIG. 1

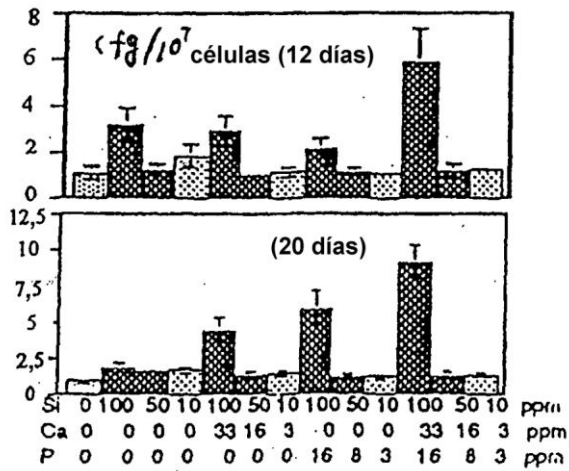
Efecto inductor sobre la proliferación de osteoblastos



Efecto inductor sobre la bioactividad de fosfatasa alcalina



Efecto inductor sobre la síntesis y secreción de osteocalcina



Efecto inductor sobre la calcificación de hueso

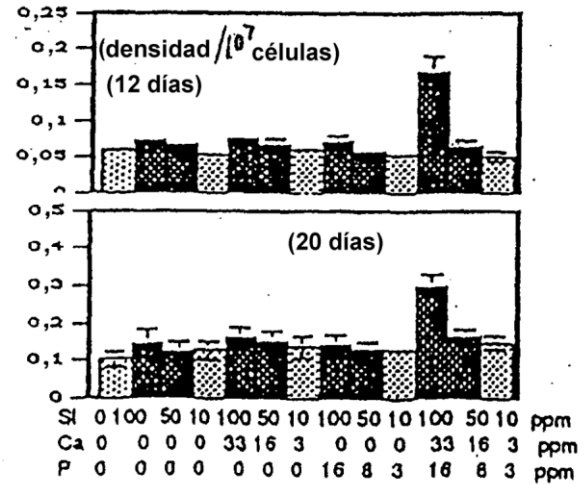
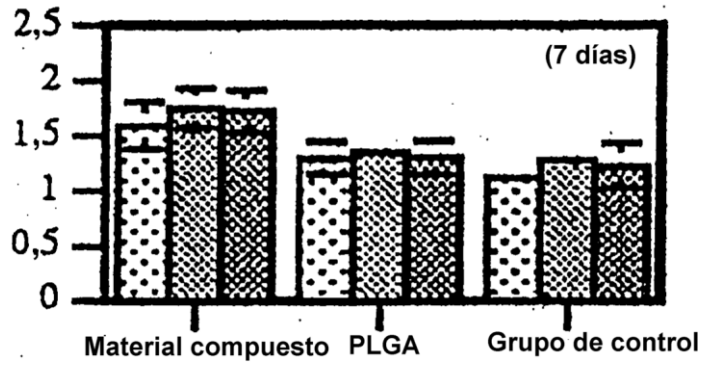
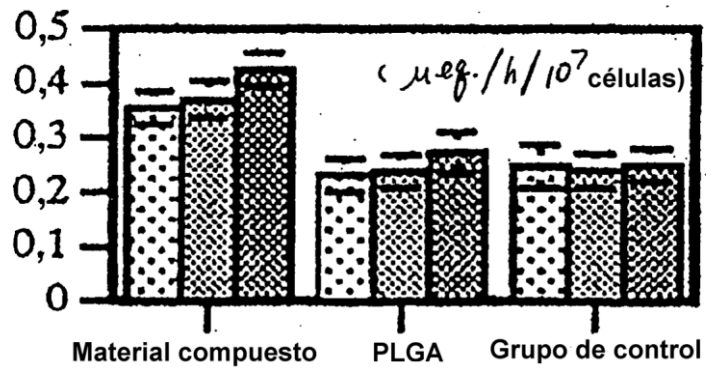


FIG. 2

Efecto inductor sobre osteoblastos normales



Efecto inductor sobre la bioactividad de fosfatasa alcalina



Osteoblasto humano normal de donante A



Osteoblasto humano normal de donante B



Osteoblasto humano normal de donante C

FIG. 3

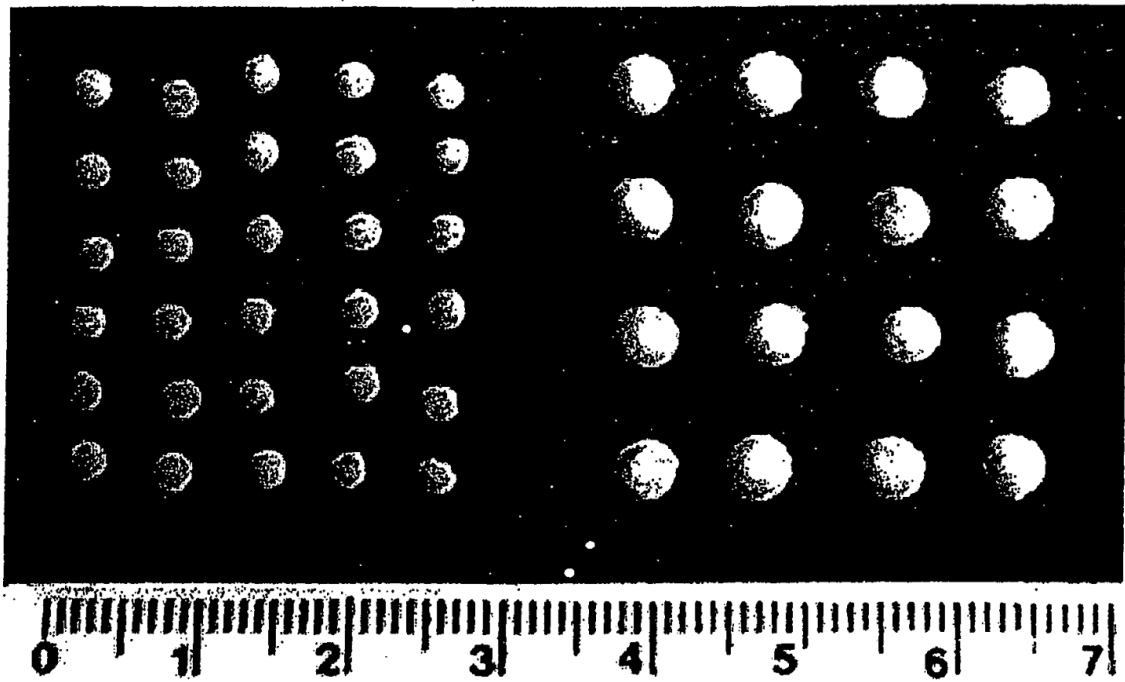


FIG. 4

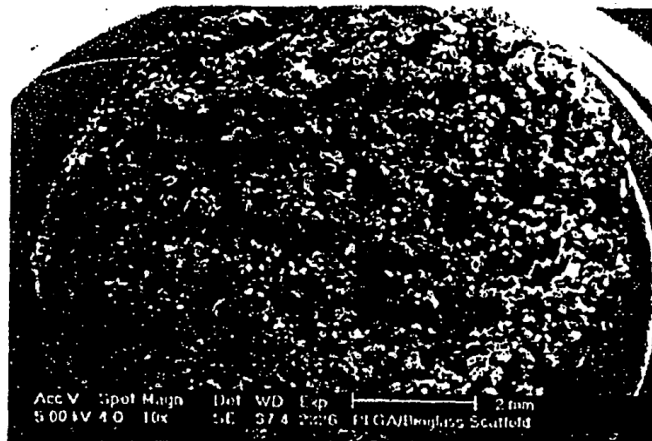
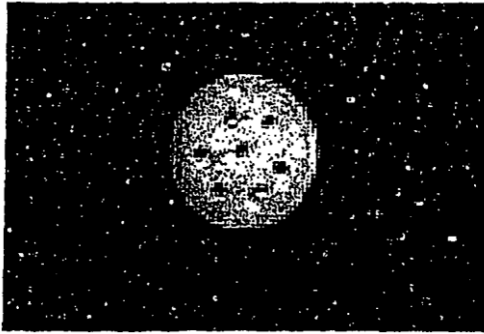


FIG. 5

Corte longitudinal



Perfil lateral

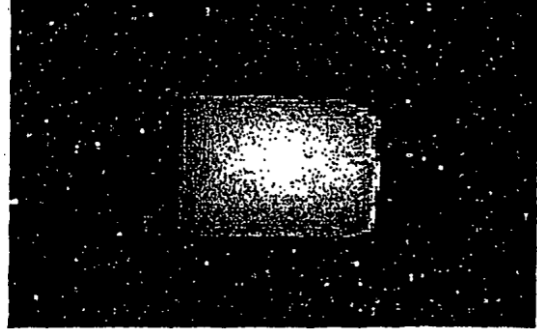


FIG. 6

a) Armazones hechos de material compuesto nanométrico para proceso condilar de articulación temporomandibular humana



b) Osteoblasto humano normal proliferado *in vitro* que muestra propiedades de osteogénesis



c) Implante de armazones hechos de material compuesto nanométrico con osteoblastos humanos normales para proceso condilar de articulación temporomandibular humana en un modelo animal



d) Formas de proceso condilar de articulación temporomandibular humana después de que se han implantado los armazones en el animal durante 6 semanas. Los ensayos histológicos muestran:

Formación de hueso humano nuevo



Formación de túbulo de Harvard



Formación de vasos sanguíneos en el hueso nuevo

