



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 373 896**

②1 Número de solicitud: 201031193

⑤1 Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)

**A61K 38/08** (2006.01)

**A61L 27/12** (2006.01)

**C07K 14/635** (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **30.07.2010**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **10.02.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**10.02.2012**

⑦1 Solicitante/s: **Universidad Complutense de Madrid  
Rectorado Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES  
Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación  
Jiménez Díaz y  
Universidad de Alcalá de Henares**

⑦2 Inventor/es: **Vallet Regi, María;  
Salinas Sánchez, Antonio Jesús;  
Manzano García, Miguel;  
Doadrio Villarejo, Juan Carlos;  
Esbrit Argüelles, Pedro;  
Buján Varela, María Julia;  
Gómez Barrena, Enrique;  
Lozano Borregón, Daniel y  
García Honduvilla, Natalio**

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

⑤4 Título: **Biomaterial con osteostatina para regeneración ósea e ingeniería tisular.**

⑤7 Resumen:

Biomaterial con osteostatina para regeneración ósea e ingeniería tisular.

La presente invención se refiere a biocerámicas bioactivas para la liberación local y controlada del pentapéptido formado por la secuencia de aminoácidos 107 a 111 (TRSAW) de la proteína relacionada con la parathormona, péptido conocido como osteostatina, e incluye los métodos utilizados para conseguir la unión del pentapéptido a la biocerámica por unión covalente o por adsorción. La inmovilización de PTHrP (107-111) en biocerámicas bioactivas permite la liberación controlada de este péptido y/o su exposición local, lo que confiere a los sistemas biocerámica bioactiva-PTHrP (107-111) capacidad osteoinductora y de osteointegración.

ES 2 373 896 A1

## DESCRIPCIÓN

Biomaterial con osteostatina para regeneración ósea e ingeniería tisular.

## 5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el campo técnico de fabricación de materiales osteoinductores para regeneración ósea e ingeniería tisular. De manera más concreta, la invención se refiere a la síntesis de biomateriales osteoinductores formados por una biocerámica bioactiva en la que se inmoviliza un péptido con propiedades que impulsan la osteogénesis, lo que da lugar a un producto con propiedades osteoformadoras. La molécula inmovilizada es el pentapéptido formado por la secuencia de aminoácidos 107 a 111 (Treonina-Arginina-Serina-Alanina-Triptófano, TRSAW) de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), pentapéptido también conocido como osteostatina. Como matriz en la que se va a inmovilizar y liberar la PTHrP (107-111), se utilizan las biocerámicas bioactivas. El resultado de la invención es susceptible de utilizarse en aplicaciones clínicas que requieran biomateriales para promover regeneración ósea y osteointegración, como los defectos óseos producidos por la extracción quirúrgica de tumores o quistes, y traumatismos en situación normal u osteopélica.

## Estado de la técnica

La reparación del daño óseo, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los órganos que tras un daño desarrollan una cicatrización fibrosa como paso previo a su normalización de aspecto y función, implica la formación de un nuevo tejido óseo, indistinguible del sano, a través de un proceso que remeda al desarrollo óseo embrionario (*Deschaseaux y cols. Trends Mol Med, 2009. 15:417-29*). Sin embargo, existen situaciones de daño osteoarticular con frecuencia irreversible, tales como las fracturas (sobre todo en presencia de osteopenia/osteoporosis), que justifican una demanda cada vez mayor de herramientas de ingeniería tisular para acelerar la regeneración ósea. Entre ellas, se han utilizado a este respecto una variedad de factores de crecimiento, aunque ninguno ideal (*Ohba y cols. IBMS BoneKEy 2009; 6:405-19*).

La PTHrP y su receptor, el receptor de PTH tipo 1 (PTHR1), se expresan en los condrocitos y en los osteoblastos; este sistema ejerce un importante papel modulador de la formación ósea en el feto y en el adulto (*Bisello y cols. Endocrinology 2004; 145: 3551-3*). La administración intermitente del fragmento N-terminal 1-36 de la PTHrP, que interacciona con el PTHR1 en los osteoblastos, aumenta la masa ósea actuando sobre la formación ósea en situación de depleción estrogénica tanto en animales como en humanos (*Stewart y cols. J Bone Miner Res 2000; 15:1517-25; Horwitz y cols. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:569-75; Horwitz y cols. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95:1279-87*).

Por otra parte, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el fragmento C-terminal 107-139 de la PTHrP, que puede generarse *in vivo* por rotura proteolítica de la proteína intacta, posee una potente acción antiresortiva atribuida a su epítipo N-terminal 107-111 -formado por la secuencia de aminoácidos Treonina-Arginina-Serina-Alanina-Triptófano (TRSAW) en humano y roedores, conocida como osteostatina- a través de sus efectos directos sobre la formación y la actividad de los osteoclastos (*Fenton y cols. Endocrinology 1991; 129: 1762-8; Cornish y cols. Endocrinology 1997; 38:1299-304*). De ahí que se haya propuesto la utilización del péptido TRSAW en el tratamiento de patologías en las que está indicada la inhibición de la resorción ósea (ES2135398T3).

Un estudio inicial en ratas ovariectomizadas para determinar la relación entre su efecto antiresortivo y una posible acción que impulsa la osteogénesis de este fragmento C-terminal de la PTHrP condujo a resultados no concluyentes (*Rouffet y cols. Reprod Nutr Dev 1994; 34:473-81*). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que ratones con delección de ambas regiones, media y C-terminal, de la PTHrP presentan osteoporosis y una disminución de la formación ósea (*Miao y cols. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 20309-14*). Además, en un estudio reciente, se ha demostrado que la administración subcutánea cada 2 días, durante 2 semanas, del fragmento nativo PTHrP (107-139), de modo similar a la del fragmento N-terminal PTHrP (1-36), revierte los efectos deletéreos de la 3-metilprednisolona y de la diabetes mellitus tipo 1 sobre la regeneración ósea tras la ablación medular en ratones [*Lozano y cols. Endocrinology 2009; 150:2027-2035; Fernández de Castro y cols. Tissue Eng Part A. 2009 Oct 27. [Epub ahead of print] PMID: 19860552; Lozano y cols. Bone 44 (Suppl. 2):S355, 2009*]. Por otra parte, la mayoría de los datos obtenidos *in vitro* en cultivos de células osteoblásticas indican que la PTHrP (107-139) y la osteostatina incrementan el crecimiento y la viabilidad así como la diferenciación de los osteoblastos (*Valín y cols. Endocrinology 2001; 142: 2752-9; Guillén y cols. J Biol Chem 2002; 277:28109-17; de Gortázar y cols. Calcif Tissue Int 2006; 79:360-9; Alonso y cols. J Cell Physiol 2008; 217:717-27; Lozano y cols. Acta Biomater. 2010; 6: 797-803*). Aunque el receptor mediador de los efectos de la PTHrP (107-111) en los osteoblastos es aún desconocido, este péptido parece interactuar con el receptor del factor vascular del endotelio tipo 2 (*de Gortázar y cols. Calcif Tissue Int 2006; Alonso y cols. J Cell Physiol 2008*).

Los hallazgos expuestos demuestran las propiedades que impulsan la osteogénesis de la PTHrP (107-139) a través de su epítipo 107-111 por interacción con los osteoblastos. Estas observaciones abren nuevas aproximaciones experimentales en ingeniería tisular para promover la reparación ósea.

## Descripción de la invención

La presente invención se refiere a biocerámicas capaces de interactuar con el tejido óseo cuando se implantan, es decir bioactivas, en las que se inmoviliza el péptido correspondiente a la secuencia 107-111 (TRSAW) (caracterizado por SEQ ID NO: 2) de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) (caracterizada por SEQ ID NO: 1).

La proteína PTHrP se ha descrito en diferentes especies animales entre las que se encuentran varios mamíferos, incluida la especie humana. Se trata de una proteína muy conservada y, en mamíferos, el péptido TRSAW se mantiene en la misma posición, es decir, la secuencia 107-111 de la PTHrP (Figura 2). En la presente invención se han utilizado como modelos la PTHrP humana (SEQ ID NO: 1) y el péptido PTHrP (107-111) (SEQ ID NO: 2) humano en representación de la proteína y el péptido de los animales mamíferos.

En esta invención se entiende por “biocerámicas bioactivas *in vivo*” aquellas cerámicas que, cuando se implantan en tejido vivo, inducen la formación de una unión mecánicamente fuerte entre la biocerámica y el tejido circundante. Aunque para algunas biocerámicas con muy alta bioactividad, particularmente ciertos vidrios, se ha descrito su capacidad de unirse también a tejidos blandos, en general, el término “bioactividad” se aplica a aquellos materiales que son capaces de unirse al hueso, evitando la formación de una cápsula fibrosa, y es así como va a utilizarse en el ámbito de esta patente.

La bioactividad de una biocerámica puede evaluarse mediante medidas mecánicas, comprobando la fortaleza de la unión entre la biocerámica y el hueso, y por estudios histológicos, comprobando la ausencia de tejido fibroso interpuesto entre la biocerámica y el tejido óseo. Para definir el grado de bioactividad de una biocerámica bioactiva *in vivo*, se ha propuesto un índice de bioactividad,  $I_B$ , definido como  $I_B = 100/t_{0.5bb}$ , donde  $t_{0.5bb}$  es el tiempo necesario para que más del 50% de la superficie del implante se haya unido al hueso (Hench, in: *Bioceramics. Materials Characteristics Versus In Vivo Behavior*, Vol. 523, eds. P. Ducheyne et al *Annals of New York Academy of Sciences*, New York, 1988, p. 54). El material para el que se ha observado mayor índice de bioactividad es el Bioglass®45S5 con un  $I_B$  de 12,5, lo que significa que tras 8 días de implantación, más de la mitad del implante se ha unido al hueso. Para el resto de las biocerámicas bioactivas *in vivo*, como la hidroxiapatita o la vitrocerámica apatita/wollastonita, se necesita un mes para llegar a esa situación, por tanto, tienen un  $I_B$  en torno a 3. Las cerámicas no bioactivas como la alúmina o la circona tienen un  $I_B = 0$  ya que nunca llegan a enlazarse al hueso.

Por otra parte, para agilizar el análisis de las nuevas cerámicas candidatas a materiales bioactivos implantables y minimizar el sufrimiento de los animales de experimentación, se propuso evaluar previamente las biocerámicas sumergiéndolas en disoluciones que simularan al plasma sanguíneo (Ogino y cols. 1980; *J Biomed Mater Res* 14: 55-64, Kokubo y cols. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 721-34). Dichos ensayos, son denominados a veces ensayos de “bioactividad *in vitro*” y permiten preseleccionar las biocerámicas más prometedoras para proseguir el estudio en cultivos celulares y modelos animales. En estos estudios se mide el tiempo necesario para que la biocerámica se recubra de una capa de nanocristales de hidroxycarbonato apatita (HCA) análogos a los del hueso, tras permanecer en un fluido biológico simulado. La validez de estos ensayos proviene de la hipótesis que considera que aquellos materiales cuya reactividad facilite la formación *in vitro* de HCA serán capaces de enlazarse firmemente al hueso cuando se implanten. Existe alguna controversia a este respecto, pues se ha encontrado que el comportamiento de algunas biocerámicas contradice dicha hipótesis. Sin embargo, estos ensayos están muy generalizados y han dado origen a una categoría de biocerámicas que en esta patente denominaremos “biocerámicas bioactivas *in vitro*” que son aquellas que se recubren de HCA tras permanecer en un fluido simulado, pero cuyo comportamiento *in vivo* aún no se conoce. Son diversos los fluidos y protocolos utilizados para estudiar la “bioactividad *in vitro*”, pero la mayoría de los autores utilizan el “Simulated Body Fluid” (SBF) propuesto por Kokubo T (*Biomaterials* 1991; 12: 155-63) y protocolos que suelen presentar variaciones pequeñas respecto al detallado por Kokubo y Takadama (*Biomaterials* 2006; 27: 2907-2915). En la mayor parte de las biocerámicas bioactivas *in vitro*, la deposición de HCA requiere entre 3 y 7 días. Sin embargo, hay biocerámicas que necesitan más de 14 días; mientras que para ciertos vidrios con mesoporosidad ordenada obtenidos con una plantilla orgánica, se ha detectado la capa HCA tras sólo 8 horas en SBF (López-Noriega y cols. *Chem Mat* 2006; 18: 3137-44), para otros materiales mesoporosos de sílice se ha visto que son necesarios 30 ó, incluso, 60 días (Izquierdo-Barba y cols. *Solid State Sci* 2005; 7: 983-989).

Si bien en la literatura científica se aplica el adjetivo “bioactivo” a una gran variedad de cerámicas, incluyendo algunas cuya bioactividad no se ha probado *in vivo* y que, *in vitro*, tardan largos periodos de tiempo en deponer en su superficie una capa de HCA, en el contexto de esta invención, con ánimo de ser estrictos, se consideran y denominan “biocerámicas bioactivas *in vitro*” aquellas en las que la deposición de la capa de HCA al permanecer en fluidos corporales simulados estándares, tiene lugar en menos de 15 días de incubación.

La invención se extiende tanto a las biocerámicas bioactivas *in vivo* aprobadas para uso clínico que ya han mostrado bioactividad tras ser implantadas, como a otras desarrolladas más recientemente, para las que sólo se sabe que son bioactivas en condiciones *in vitro*. Las biocerámicas bioactivas *in vivo* comerciales se pueden agrupar en tres grupos:

- Fosfatos de calcio. En esta categoría se incluyen la hidroxiapatita, la hidroxycarbonato apatita, la hidroxiapatita dopada con silicio o la hidroxycarbonato apatita conteniendo matriz orgánica de origen natural. Todos estos fosfatos de calcio pueden presentar diferente: (i) *tamaño de cristal*: que puede variar desde unos pocos micrómetros, hasta tamaño nanométrico, como el de las apatitas biológicas, (ii) *porosidad y superficie específica*, (iii) *cantidad y tipo de sustituyentes* y (iv) *origen*: pueden ser sintéticos o naturales, en este último caso proceden-

tes de animales o de corales. Diversas biocerámicas bioactivas basadas en fosfatos de calcio se comercializan bajo nombres comerciales como: Osteograft<sup>®</sup>, Frios<sup>®</sup>, Norian<sup>®</sup> SRS, Apatos<sup>®</sup>, Gen-Os<sup>®</sup>, Putty<sup>®</sup>, Laddec<sup>®</sup>, Endobon<sup>®</sup>, Easygraft<sup>®</sup>, Actifuse<sup>®</sup> ABX o Pro Osteen<sup>®</sup>.

- 5 - Biovidrios. La mayoría de los vidrios bioactivos comerciales se obtienen por fusión y enfriamiento rápido. En este caso el contenido en SiO<sub>2</sub> es cercano al 50%. Están empezando a comercializarse vidrios obtenidos por sol-gel que, por su gran porosidad y superficie específica, pueden presentar bioactividad hasta el 90% en SiO<sub>2</sub>. A continuación, se indican algunos biovidrios comerciales y su composición, expresada como porcentajes en peso, todos ellos obtenidos por fusión, excepto TheraGlass<sup>®</sup> por sol-gel: Novabone<sup>®</sup>45S5: 46.1% SiO<sub>2</sub> - 24.4% Na<sub>2</sub>O - 26.9% CaO - 2.6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; Bioactive glass 13-93: 54.6% SiO<sub>2</sub> - 6% Na<sub>2</sub>O - 22.1% CaO - 1.7% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - 7.9% K<sub>2</sub>O - 7.7% MgO; BoneAlive<sup>®</sup> S53P4: 53.86% SiO<sub>2</sub> - 22.65% Na<sub>2</sub>O - 21.77% CaO - 1.72% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; Stronbone<sup>®</sup>: 44.47% SiO<sub>2</sub> - 27.26% Na<sub>2</sub>O - 21.47% CaO - 2.39% SrO - 4.42% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o TheraGlass<sup>®</sup>: 70 mol% SiO<sub>2</sub> - 30% CaO.
- 10
- 15 - Biovitrocerámicas. Al desvitrificar parcialmente un vidrio se obtienen vitrocerámicas con menor bioactividad pero con mejor comportamiento mecánico que el vidrio de partida. A continuación se citan algunas biovitrocerámicas comerciales junto con la fase/fases cristalinas formadas en la desvitrificación: Ceravital<sup>®</sup>: apatita; Cerabone<sup>®</sup> A/W: apatita y wollastonita; Ilmaplant<sup>®</sup>: apatita y wollastonita; Bioverit<sup>®</sup> I: apatita y flogopita; Bioverit<sup>®</sup> II: mica y cordierita.
- 20

En cuanto a las biocerámicas en proceso de estudio que han mostrado bioactividad *in vitro* se incluyen expresamente los vidrios de mesoporosidad ordenada obtenidos con una plantilla orgánica, algunos de los cuales sólo tardan 8 horas en recubrirse de HCA. La invención también se extiende a materiales híbridos orgánico-inorgánicos que presentan bioactividad *in vitro* con interesantes propiedades mecánicas y de disolución para aplicaciones clínicas específicas. Entre ellos los pertenecientes a los sistemas CaO-SiO<sub>2</sub>-polidimetilsiloxano y CaO-SiO<sub>2</sub>-polivinil alcohol (*Salinas y cols. Key Eng. Mat. 2004: 254-256: 481-484*) y otros sistemas relacionados (*Manzano y cols. Prog Sol Stat Chem 2006; 34: 267-277, Colilla y cols. Chem. Mater. 2006; 18: 5676-5683, Salinas y cols. Chem Mater 2009; 21: 41-47*) o los llamados geles estrella ("star gels") por su característica estructura que produce unas destacadas propiedades mecánicas (*Manzano y cols. Chem Mater 2006; 18: 5696-5703*).

25

30

Las principales aplicaciones de las biocerámicas bioactivas son el relleno de defectos óseos y periodontales, la fabricación de piezas pequeñas y el recubrimiento de prótesis. En el tratamiento de defectos óseos producidos por diversas patologías o traumatismos, hay situaciones (p.e., cuando dichos defectos superan un cierto tamaño, alcanzando la consideración de defectos críticos) en las que es necesario utilizar técnicas de ingeniería tisular para promover la regeneración ósea. En este sentido, es necesario un material que aporte propiedades mecánicas y que promueva la osteoregeneración. Por ello, disponer de un procedimiento que confiera carácter osteoinductor a las biocerámicas bioactivas, como el que se describe en esta patente, aumenta sus prestaciones terapéuticas, acortando significativamente el proceso de reparación al aumentar la cantidad y calidad de tejido óseo neoformado. De tal forma, sus aplicaciones en regeneración ósea e ingeniería tisular ósea se amplían, por ejemplo, a: reparación de lesiones locales óseas (osteonecrosis, fracturas y traumatismos), neoformación ósea en defectos dentales y osteoregeneración en sujetos osteopénicos/osteoporóticos.

35

40

En la presente invención, el término osteoinductor se utiliza para designar aquellos materiales cuya actividad induce osteogénesis actuando sobre células osteoprogenitoras y promoviendo su diferenciación a osteoblastos.

45

La unión de la PTHrP (107-111) a una biocerámica bioactiva produce un efecto sinérgico que conduce a materiales con características osteoinductoras, por tanto con condiciones mejoradas con respecto a cada uno de los elementos por separado, con propiedades y características idóneas para aplicaciones de ingeniería tisular ósea. En primer lugar, le confiere carácter local, ya que actúa fundamentalmente en el sitio de implantación, lo que permite disminuir la dosis de PTHrP (107-111) y reducir los efectos secundarios potenciales. En segundo lugar, la retención que ejerce la biocerámica sobre el pentapéptido, que produce una liberación retardada y controlada del mismo, puede ser considerada como una nueva propiedad de este pentapéptido que, al contar con un adecuado soporte y una adecuada liberación, proporciona carácter osteoinductor al conjunto "biocerámica + pentapéptido" de la presente invención.

50

55

Los sistemas biocerámica-PTHrP (107-111) obtenidos presentan propiedades osteoinductoras con independencia del grado de bioactividad *in vivo* o *in vitro* que presente la cerámica soporte del péptido. Ello justifica su utilización para el tratamiento de lesiones óseas. La forma más sencilla de efectuar la carga del péptido se realiza sumergiendo la biocerámica bioactiva en una disolución de PTHrP (107-111), preferentemente en solución salina fosfatada a pH fisiológico, donde se mantiene en agitación entre 12 y 48 horas a 2-10°C. De este modo, la actividad biológica del péptido no se ve afectada tras su inmovilización en la biocerámica a través de interacciones electrostáticas.

60

También se describe en esta invención un método para controlar la interacción entre el péptido y la biocerámica, que comprende funcionalizar la superficie de la biocerámica con grupos de diferente naturaleza química, tamaño y afinidad por el agua. La funcionalización química de la superficie de la biocerámica se facilita por la presencia de grupos silanol (Si-OH) en su superficie. Estos grupos están presentes en la mayoría de las biocerámicas que presentan bioactividad (*in vivo* o *in vitro*) que se incluyen en la invención, como los biovidrios, de fusión y sol-gel, las biovitrocerámicas, los vidrios con plantilla o los materiales híbridos orgánico-inorgánicos. La hidroxiapatita y compuestos relacionados carecen de grupos silanol en superficie, pero éstos pueden generarse dopando los materiales con silicio. De esta forma

65

la funcionalización de las biocerámicas puede realizarse con grupos alquílicos apolares de diferente longitud, desde 1 átomo de carbono (C1, -Si-CH<sub>3</sub>) hasta 18 (C18, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>) pasando por C3, C4, C8, etc. También se puede realizar con grupos polares como: -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SH, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CN, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOH, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Cl, con anillos aromáticos, como -Si-fenilo, -Si-benzilo, y con muchos otros grupos como aminas cuaternarias de cadena corta -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> o de cadena larga -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>, diaminas conteniendo una primaria y una secundaria, como -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, conteniendo átomos de fósforo, como -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-PO-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, derivados del ácido acrílico -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OCOC(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub> o incluso dendrímeros de poli(propileno imina) (PPI) con x = 3, 7 y 15, de fórmula -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-CO-NH-(PPI)-(NH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>, (Vallet-Regí y col. *Angew Chem Int Ed* 2007; 46: 7548-7558 Manzano y cols. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6:1383-1400; Manzano y Vallet-Regí *J Mater Chem* 2010; 20: 5593-5604). Tras cargar la PTHrP (107-111) en los materiales funcionalizados se obtienen sistemas que también presentan propiedades osteoinductoras. Sin embargo, dichas propiedades varían respecto al material sin funcionalizar y también en función del agente utilizado para la funcionalización.

Alternativamente, el péptido PTHrP (107-111) se puede inmovilizar de forma covalente sobre la superficie de la biocerámica, previamente funcionalizada con grupos amino. El pentapéptido, que puede ser activado en su extremo carboxílico utilizando una carbodiimida, formará un enlace covalente tipo amida con la superficie de la biocerámica que dificultará la lixiviación al medio de la osteostatina.

Los materiales objeto de esta invención pueden manipularse para adaptar su forma física a su uso particular como relleno de defectos periodontales y óseos producidos por tumores o traumatismos y para estimular la reparación ósea en el hueso normal u osteoporótico, elaborando los preparados adecuados. Así, pueden fabricarse con forma de andamios tridimensionales macroporosos, utilizando técnicas de prototipado rápido, o bien compactando los materiales en forma de partículas mediante prensado uniaxial utilizando moldes con la forma y tamaño deseado para las piezas seguido de prensado isostático en frío.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto osteogénico de la PTHrP (107-111) cargada en distintas biocerámicas utilizando cultivo de células osteoblásticas *in vitro*. A) Mineralización por absorción de rojo de alizarina en las células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 en presencia o ausencia de nanohidroxiapatita dopada con silicio, (nHA-Si), cargada o no con la osteostatina inmovilizada por adsorción a los 12 días de cultivo. B) Mineralización (determinada con rojo de alizarina a los 12 días de cultivo), así como síntesis de colágeno y proliferación (medida por exclusión de azul de tripán) a los 2 días, en células MC3T3-E1 en presencia de HA-Si-NH<sub>2</sub> con PTHrP (107-111) -activada o no con EDC- e inmovilizada por unión covalente o sin el péptido (control), a los 2 días de cultivo. Los resultados (media±EEM) preliminares corresponden a 2 experimentos por duplicado.

Figura 2. Alineamiento de proteínas pertenecientes a la familia de la hormona paratiroidea. Se han alineado algunas de las PTHrP conocidas de mamíferos y aves con la de la especie humana. En el caso de la proteína del gato y de la oveja, la secuencia no está completa. En letra blanca con fondo negro se destaca la identidad del PTHrP (107-111) en las distintas secuencias, que es del 100% en los mamíferos y del 80% en el caso de la secuencia de ave.

### Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

#### Ejemplo 1

##### Inmovilización de la osteostatina por adsorción

Para inmovilizar la osteostatina en la biocerámica hidroxiapatita (HA) dopada con silicio de tamaño de partícula nanométrico, nHA-Si, se sumergió la biocerámica en una disolución del pentapéptido PTHrP (107-111) de concentración 100 nM en solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico a 4°C durante 24 horas con agitación (Zambonin y col *J Bone Joint Surg* 2000; 82:457-60) en condiciones estériles. Tras ese tiempo, los materiales se secaron al aire a temperatura ambiente en condiciones estériles.

La comprobación de que la carga peptídica había sido efectiva se realizó: bien incluyendo un trazador, [<sup>125</sup>I-[Tyr<sup>116</sup>] PTHrP (107-115)] o similar conteniendo la secuencia 107-111, junto a la osteostatina sin marcar durante la carga, como se ha indicado (Lozano y cols. *Acta Biomater.* 2010; *Acta Biomater.* 6: 797-803); o bien por HPLC de los eluidos tras su concentración y eliminación de sales con cartuchos de C18.

Para determinar la capacidad para impulsar la osteogénesis de nHA-Si cargada o no con la osteostatina, se analizó la mineralización en cultivos de células osteoblásticas de ratón bien caracterizadas: MC3T3-E1. Para ello, las células fueron sembradas a una densidad inicial de 20.000 células/cm<sup>2</sup> en medio  $\alpha$ -MEM y SFB al 10%, 1% de penicilina-estreptomina y L-glutamina 5 mM en pocillos de una placa P-6 conteniendo el biomaterial. Las células se cultivaron en medio de diferenciación (con ácido ascórbico 50  $\mu$ g/ml y  $\beta$ -glicerolfosfato 10 mM) durante 12 días. A continuación, las células se fijaron con etanol 70% durante 1 hora y, posteriormente, se añadió rojo de alizarina 40 mM, pH 4.2,

## ES 2 373 896 A1

durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células con tampón salino y agua destilada, la tinción se eluyó con cloruro de cetilpiridinio al 10% en fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, midiendo la absorbancia a 620 nm. En la Fig. 1A se describe el aumento de mineralización inducido en estas células por la presencia del péptido de la PTHrP.

5

### Ejemplo 2

#### *Inmovilización covalente de la osteostatina*

10

Se realizó la inmovilización covalente del péptido PTHrP (107-111) sobre la hidroxiapatita dopada con silicio de tamaño nanométrico, nHA-Si, mediante la formación de un enlace tipo amida. Para ello se funcionalizó la superficie de la hidroxiapatita dopada con silicio con grupos amino mediante la condensación de los grupos silanol de la superficie de la biocerámica con aminopropil trietoxisilano (APTES). Para realizar la funcionalización, se sumergieron las piezas de biocerámica, que previamente habían sido secadas durante 2 horas a 90°C, en tolueno y se añadió un exceso de APTES y se puso a reaccionar durante toda la noche a 110°C con agitación magnética. Transcurrido ese tiempo, las piezas fueron lavadas sucesivamente con tolueno, éter y etanol (este último lavado para esterilizar).

15

Por otro lado, el péptido PTHrP (107-111) se activó en su extremo carboxílico usando [1-Etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida] (EDC) en condiciones acuosas. Para ello, se preparó una disolución acuosa tamponada a pH 4.8 (tampón acetato) del péptido PTHrP (107-111) (2 mg/mL) a la que se le añadió un exceso de EDC, agitando a continuación a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, las piezas se introdujeron en una disolución acuosa tamponada a pH 8 (tampón fosfato) (previamente lavadas un par de veces con esta misma disolución). A continuación, a cada una de las piezas de la biocerámica se les añadieron 50  $\mu$ L de la disolución de PTHrP (107-111) activado con EDC. Con el objetivo de comparar el efecto activador de la EDC sobre las piezas del mismo material, y siguiendo el mismo protocolo, se añadieron 50  $\mu$ L de disolución del péptido PTHrP (107-111) sin EDC. Los materiales fueron agitados en un agitador orbital durante 12 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, lavados sucesivamente con disolución tamponada a pH 8 y, finalmente, se secaron a temperatura ambiente. La carga del péptido fue cuantificada mediante microanálisis y HPLC de los eluidos.

20

25

Previo a su exposición a los cultivos celulares, los biomateriales se esterilizaron por inmersión en etanol al 70% y/o exposición de una noche a radiación ultravioleta en una cámara de flujo laminar para cultivo celular.

30

Para determinar la capacidad para impulsar la osteogénesis de estas biocerámicas dopadas o no con la osteostatina, las células MC3T3-E1 se sembraron como se ha indicado en el Ejemplo 1 en pocillos de P6 con los distintos biomateriales durante 2 días para analizar la proliferación celular y la síntesis de colágeno. En el primer caso, las células no adheridas recogidas y mezcladas con las adheridas (después de una tripsinización suave) fueron teñidas con azul de tripán al 4% (1:1, v/v). El número total de células se contó en un hemocitómetro. Alternativamente, el crecimiento celular se analizó utilizando un ensayo estándar colorimétrico (*CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Assay*; Promega, Madison, WI). Del medio condicionado celular (2 ml) se pipetearon 100  $\mu$ L en pocillos de una placa P-96. A continuación, se añadió 20  $\mu$ L de una solución que contenía 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y el agente acoplador de electrones etosulfato de fenazina, que combinado con MTS forma una sal estable, incubando durante dos horas. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector Opsys MR Reader (Dyner Technologies, Chantilly, VA).

35

40

45

La síntesis de colágeno se analizó con un método estándar (*Sircol<sup>™</sup> collagen assay*, Biocolor, Newtownabbey, Irlanda del Norte). Las células se levantaron de la monocapa raspando y resuspendiendo en tampón salino fosfatado, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y se incubaron en ácido acético 0,5 M durante 30 minutos. El sobrenadante resultante se incubó en agitación con Rojo Sirio (que se une al colágeno tipo I y V) durante 30 minutos, midiendo la absorbancia a 540 nm. La cantidad de colágeno se determinó frente a una curva estándar de concentraciones conocidas de colágeno y se normalizó por el contenido proteico celular. La mineralización se analizó como en el Ejemplo 1.

50

55

La presencia de osteostatina se asoció con un aumento de la proliferación y de la función osteoblástica (síntesis de colágeno y capacidad de mineralización), respecto a los materiales sin el péptido cargado, en estas células (Fig. 1B).

60

65

REIVINDICACIONES

1. Biomaterial que comprende:

- 5
- una biocerámica seleccionada entre el grupo formado por las biocerámicas bioactivas *in vivo* y las biocerámicas cuya bioactividad se determina *in vitro*, en medios de cultivo estándares que simulan fluidos corporales, mediante la detección en menos de 15 días de una capa de nanocristales de hidroxicarbonato apatita sobre la propia biocerámica bioactiva *in vitro*;
  - 10 - el péptido PTHrP (107-111), denominado osteostatina y **caracterizado** por SEQ ID NO: 2.

2. Biomaterial, según la reivindicación 1, en el que la biocerámica bioactiva *in vivo* seleccionada es un fosfato de calcio, un biovidrio, una biovitrocerámica, un material híbrido orgánico-inorgánicos o un gel estrella.

3. Biomaterial, según la reivindicación 2, en el que el fosfato de calcio seleccionado es la nanoapatita.

4. Método para fabricar el biomaterial definido en las reivindicaciones 1-3 que comprende sumergir la biocerámica bioactiva *in vivo* o *in vitro* en una disolución de PTHrP (107-111), entre 12 y 48 horas, a una temperatura de 2-10°C.

5. Método, según la reivindicación 4, que comprende un paso previo de funcionalización de la biocerámica a través de los grupos silanol (Si-OH) que hay en su superficie.

6. Método para fabricar el biomaterial definido en las reivindicaciones 1-3 que comprende:

- 25
- la funcionalización de la biocerámica mediante un grupo amino;
  - la activación del extremo carboxílico del péptido PTHrP (107-111), **caracterizado** por SEQ ID NO: 2, mediante una carbodiimida;
  - 30 - la inmovilización covalente del péptido PTHrP (107-111) **caracterizado** por SEQ ID NO: 2, sobre la superficie de la biocerámica.

7. Uso del biomaterial definido en las reivindicaciones 1-3 o elaborado según los métodos de las reivindicaciones 4-6 en la elaboración de un preparado para regeneración ósea.

8. Uso del biomaterial definido en las reivindicaciones 1-3 o elaborado según los métodos de las reivindicaciones 4-6 en la fabricación de un preparado para ingeniería tisular ósea.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 en el que la regeneración ósea y/o la ingeniería tisular ósea son necesarias para reparación de lesiones locales óseas y/o neoformación ósea en defectos dentales y osteoregeneración en sujetos osteopénicos/osteoporóticos.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en el que el preparado está indicado para especies animales de mamífero, incluida la especie humana.

Fig. 1 A

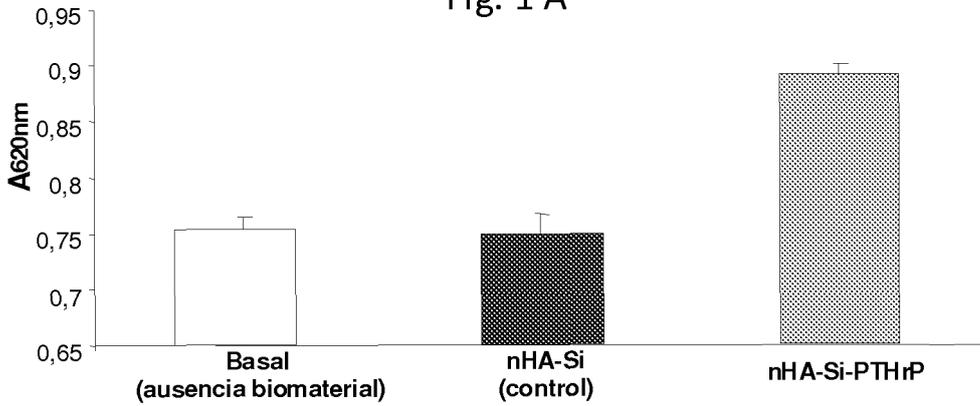


Fig. 1 B

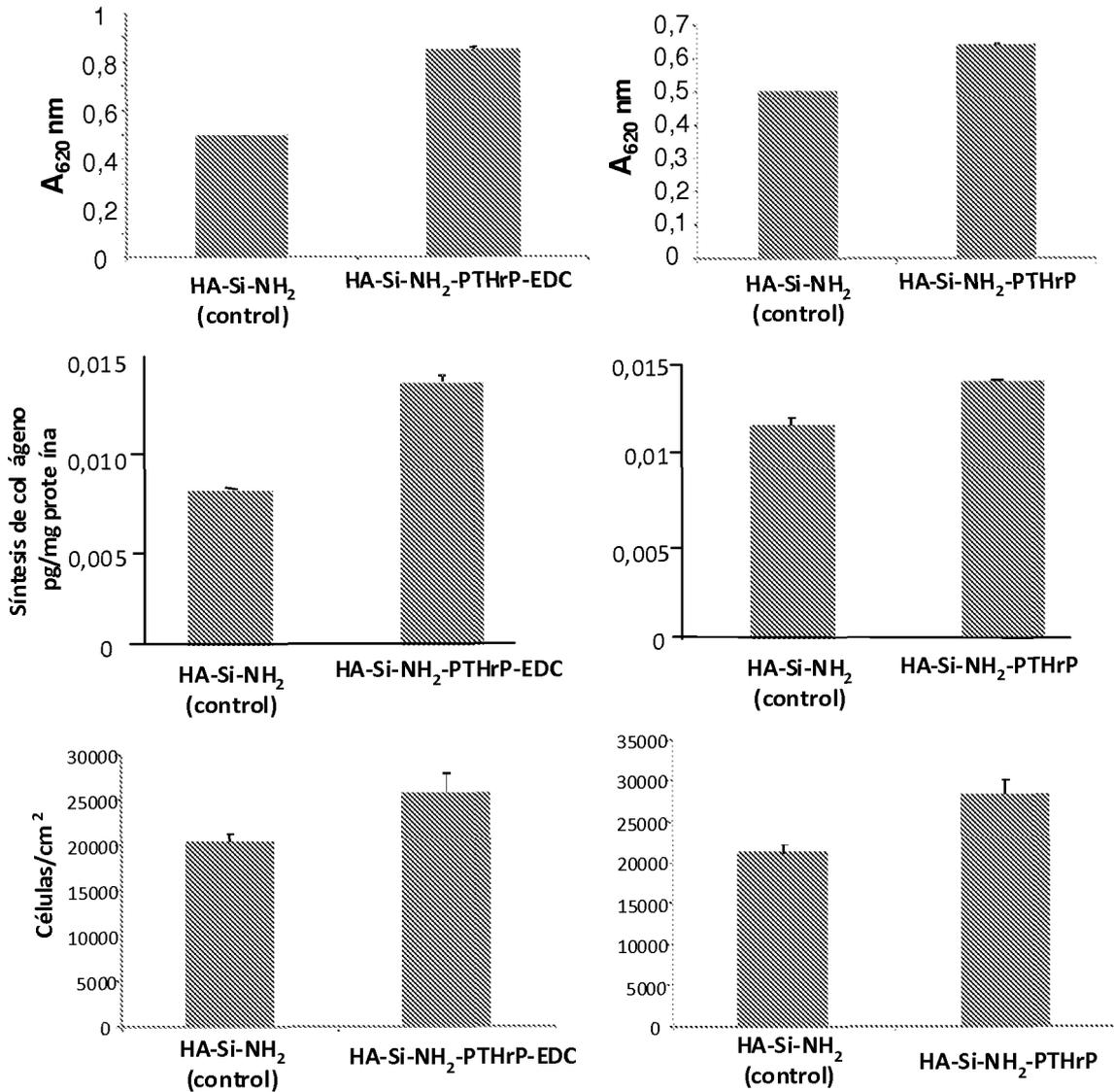
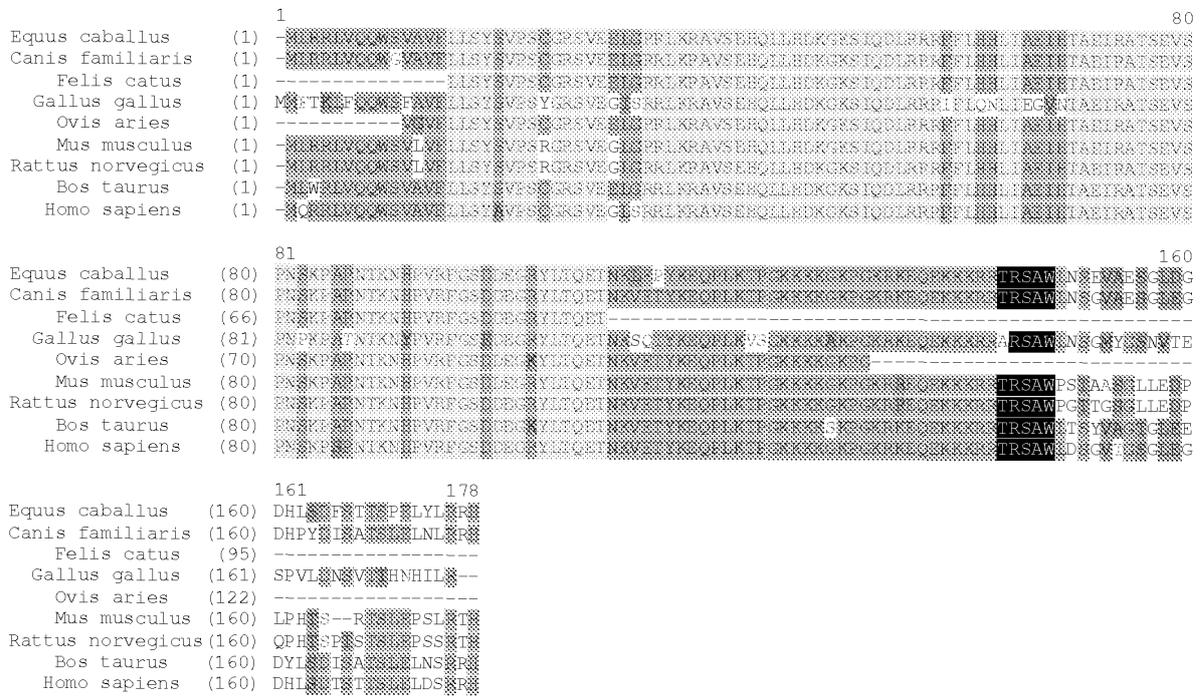


Fig. 2



# ES 2 373 896 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad Complutense de Madrid,  
Fundación Jiménez Díaz,  
5 Universidad de Alcalá de Henares
- <120> Biomaterial con osteostatina para regeneración ósea e ingeniería tisular
- 10 <160> 2
- <210> 1  
<211> 177
- 15 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*
- <220>  
20 <221> SIGNAL  
<222> (-36)...(-13)
- <220>  
25 <221> PROPEP  
<222> (-12)...(-3)
- <220>  
30 <221> CHAIN  
<222> (1)...(141)
- <220>  
35 <221> SITE  
<222> (107)...(111)  
<223> osteostatina
- 40 <300>  
<301> Suva, L.J., Winslow, G.A., Wettenhall, R.E.H., Hammonds, R.G., Moseley, J.M., Diefenbach-Jagger, H.,  
Rodda, C.P., Kemp, B.E., Rodriguez, H., Chen, E.Y., Hudson, P.J., Martin, T.J. y Wood, W.I.
- 45 <302> A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression  
<303> Science  
<304> 237  
<305> 4817
- 50 <306> 893-896  
<307> 1987  
<308> UniProtKB P12272
- 55 <309> 1989-10-01
- <400> 1
- |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 60 | Met | Gln | Arg | Arg | Leu | Val | Gln | Gln | Trp | Ser | Val | Ala | Val | Phe | Leu | Leu |
|    |     | -35 |     |     |     |     | -30 |     |     |     |     | -25 |     |     |     |     |
|    | Ser | Tyr | Ala | Val | Pro | Ser | Cys | Gly | Arg | Ser | Val | Glu | Gly | Leu | Ser | Arg |
|    | -20 |     |     |     |     | -15 |     |     |     |     | -10 |     |     |     |     | -5  |
|    | Arg | Leu | Lys | Arg | Ala | Val | Ser | Glu | His | Gln | Leu | Leu | His | Asp | Lys | Gly |
| 65 |     |     |     |     | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |
|    | Lys | Ser | Ile | Gln | Asp | Leu | Arg | Arg | Arg | Phe | Phe | Leu | His | His | Leu | Ile |
|    |     |     | 15  |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031193

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LOZANO D., et al. LOZANO D., et al. "Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation" Acta Biomaterialia (27 agosto 2009) vol. 6; páginas 797-803; DOI: 10.1016/j.actbio.2009.08.033; todo el documento.	1,2,4,5
Y		3
Y	EP 1442755 A1 (DEPUY PRODUCTS, INC.) 04.08.2004, todo el documento.	3
A	WO 2010048610 A2 (OSTEOTECH, INC.) 29.04.2010, todo el documento.	1-10
A	VALLET-REGÍ M. "Revisiting ceramics for medical applications" The Royal Society of Chemistry (03 octubre 2006) páginas 5211-5220; DOI: 10.1039/B610219K; todo el documento.	1-10
A	ARCOS D. et al. "Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration" Acta Biomaterialia (10 febrero 2010) Vol. 6; páginas 2874-2888; DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.012; todo el documento.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
12.01.2012

Examinador  
M. M. García Coca

Página  
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K7/06** (2006.01)

**A61K38/08** (2006.01)

**A61L27/12** (2006.01)

**C07K14/635** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.01.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 3-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 2	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 6	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-5, 7-10	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LOZANO D., et al. "Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation" Acta Biomaterialia (27 agosto 2009) vol. 6; páginas 797-803; DOI: 10.1016/j.actbio.2009.08.033.	27.08.2009
D02	EP 1 442 755 A1 (DEPUY PRODUCTS, INC.)	04.08.2004
D03	WO 2010/048610 A2 (OSTEOTECH, INC.)	29.04.2010
D04	VALLET-REGÍ M. "Revisiting ceramics for medical applications" The Royal Society of Chemistry (03 octubre 2006) páginas 5211-5220; DOI: 10.1039/B610219K.	03.10.2006
D05	ARCOS D. et al. "Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration" Acta Biomaterialia (10 febrero 2010) Vol. 6; páginas 2874-2888; DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.012.	10.02.2010

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-10, es un biomaterial que comprende una biocerámica y el péptido PTHrP (107-111) también denominado osteostatina (reiv. 1-3). Es también objeto de la invención métodos para fabricar el biomaterial (reiv. 4-6) y el uso del mismo para la elaboración de un preparado para regeneración ósea y para ingeniería tisular (reiv.7-10).

**1. Novedad (Art. 6.1 Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga un biomaterial formado por una biocerámica bioactiva y por osteostatina.

A la vista del documento D01, la invención según se recoge en las reivindicaciones 1 y 2 carecen de novedad según el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, y por lo tanto, también de actividad inventiva según el art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.

**2. Actividad Inventiva (Art. 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento más cercano del estado de la técnica es el documento D01 que divulga un biomaterial formado por una biocerámica bioactiva y por osteostatina.

La diferencia entre el D01 y el objeto de la invención según se recoge en la reivindicación 3, es que la biocerámica es una nanoapatita. Sin embargo, en el documento D02 se divulga un implante que comprende un biomaterial biocompatible, recubierto de nanocristales de apatita para regeneración ósea, en cuyos poros se incorpora un agente biológico osteoinductor y/o osteoconductor, que puede ser un péptido, o una proteína, como las BMPs (ver página 3 párrafo [0013] y página 5 párrafo [0031]).

A la vista del documento D02, resultaría obvio para un experto en la materia utilizar la nanoapatita como biocerámica para obtener un biomaterial para la regeneración ósea, al cual se le puede unir un péptido como la osteostatina.

Como ya se ha comentado anteriormente, el documento D01 divulga un biomaterial formado por una biocerámica bioactiva y por osteostatina. Este documento también divulga un método para fabricar el biomaterial que consiste en sumergir la biocerámica en una disolución del PTHrP en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH fisiológico a 4°C durante 24 horas con agitación.

La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 4 y 5, es que el material es una biocerámica de material mesoporoso a base de silicio, en vez de una nanoapatita. Sin embargo, la elección del material no afecta al método, ya que para un experto en la materia, sería obvio utilizar el método divulgado en el documento D01 con otro tipo de biocerámica y tener una expectativa razonable de éxito. Por otra parte, es conocido en el estado de la técnica la funcionalización de biocerámicas a través de grupos silanol en su superficie (ver documentos D04 y D05). Por lo tanto, el método reivindicado en las reivindicaciones 4 y 5 carece de actividad inventiva.

A la vista de los documentos D01 y D02, que divulgan el uso de biomateriales tales como biocerámicas con péptidos y/o proteínas osteoinductoras, es obvio para un experto en la materia utilizar el biomaterial de la invención para la elaboración de un preparado para la regeneración ósea o para ingeniería tisular ósea, ya que es conocido en el estado de la técnica que tanto el biomaterial de la invención, como el péptido osteostatina son utilizados para la regeneración ósea y la osteointegración

Por lo tanto, a la vista de los documentos D01 y D02, aunque el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 3-5 y 7-10 es nuevo en el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes, carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.