

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 141**

51 Int. Cl.:

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 27/28 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

A61C 8/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2004 E 04791593 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1689460**

54 Título: **Biomateriales compuestos que comprenden materiales de fosfato cálcico, colágeno y glicosaminoglicanos**

30 Prioridad:

28.10.2003 GB 0325161

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.03.2013

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)
THE OLD SCHOOLS TRINITY LANE
CAMBRIDGE CAMBRIDGESHIRE CB2 1TN, GB**

72 Inventor/es:

**LYNN, ANDREW;
CAMERON, RUTH;
BEST, SERENA y
BONFIELD, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 397 141 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

Biomateriales compuestos que comprenden materiales de fosfato cálcico, colágeno y glicosaminoglicanos

5 La presente invención se relaciona con el campo de huesos sintéticos, materiales dentales y soportes de regeneración para aplicaciones biomédicas y, particularmente, a huesos sintéticos, materiales dentales y soportes de regeneración y sus precursores que comprenden un triple coprecipitado que comprende colágeno, un material de fosfato cálcico y uno o más glicosaminoglicanos.

10 El hueso natural es un biocompuesto de colágeno, fases orgánicas no colagenosas que incluyen glicosaminoglicanos, y fosfato cálcico. Su estructura jerárquica compleja conduce a propiedades mecánicas excepcionales, que incluyen alta rigidez, resistencia, y dureza a la fractura, que a su vez permite a los huesos soportar las tensiones fisiológicas a las que se someten diariamente. El reto enfrentado por los investigadores en el campo es preparar un material sintético que tiene una composición y estructura que permite el crecimiento del hueso natural en y alrededor del material sintético en el ser humano o el cuerpo del animal.

15 Se observó que el hueso se une directamente a los fosfatos de calcio en el cuerpo humano (una propiedad denominada bioactividad) a través de una capa de apatita similar al hueso formada en el ambiente del cuerpo. El colágeno y copolímeros que comprenden colágeno y otros biorgánicos tales como glicosaminoglicanos por otra parte, se conocen que son sustratos óptimos para la adhesión y proliferación de numerosos tipos de células, que incluyen aquellos responsables de la producción y el mantenimiento de los huesos en el cuerpo humano.

20 La hidroxiapatita es el fosfato cálcico más usado comúnmente como constituyente en los materiales sustitutos de los huesos. Es, sin embargo, un material relativamente insoluble cuando se compara con otras formas de materiales de fosfato cálcico tales como brushita, fosfato tricálcico y fosfato octacálcico. La relativamente baja solubilidad de la apatita puede ser una desventaja cuando se produce un biomaterial como la velocidad de resorción del material en el cuerpo es particularmente lenta.

25 Los fosfatos de calcio tales como la hidroxiapatita son materiales mecánicamente rígidos. Sin embargo, son relativamente frágiles cuando se comparan con el hueso natural. El colágeno es un material mecánicamente resistente, pero tiene una rigidez relativamente baja cuando se compara con el hueso natural. Los materiales que comprenden copolímeros de colágeno y glicosaminoglicanos son tanto más duros como más rígidos que el colágeno solo, pero todavía tienen la rigidez relativamente baja cuando se comparan con el hueso natural. "

30 Los intentos previos en la industria anterior para producir un material sintético sustituto del hueso que tiene dureza mecánica mejorada más que la hidroxiapatita y rigidez mejorada más que el colágeno y copolímeros de colágeno y glicosaminoglicanos incluyen combinar el colágeno y apatita por mezclado mecánico. Un método mecánico de este tipo se describe en EP-A-0164 484.

35 Los desarrollos posteriores en la tecnología incluyen producir un material de reemplazo de los huesos que comprende hidroxiapatita, colágeno y condroitina-4-sulfato por el mezclado mecánico de estos componentes. Esto se describe en EP-A-0214070. Este documento describe además la reticulación dehidrotérmica del condroitina-4-sulfato al colágeno. Se encontró que los materiales que comprenden apatita, colágeno y condroitina-4-sulfato tienen buena biocompatibilidad. El mezclado mecánico de apatita con colágeno, y opcionalmente condroitina-4-sulfato, forma prácticamente partículas de apatita recubiertas de colágeno /condroitina-4-sulfato. Se encontró que dicho material, aunque biocompatible, produce crecimiento limitado del hueso natural en el caso del cuerpo humano o animal y no restaura la fase de fosfato cálcico del material sintético.

40 La presente invención trata de abordar al menos algunos de los problemas asociados con la técnica anterior.

45 La presente invención proporciona un proceso para la producción de un material compuesto que comprende colágeno, brushita y uno o más de glicosaminoglicanos, dicho proceso comprende las etapas de

proporcionar una solución acuosa ácida que comprende colágeno, una fuente de calcio y una fuente de fósforo y uno o más glicosaminoglicanos, y

precipitar el colágeno, la brushita y el uno o más glicosaminoglicanos juntos de la solución acuosa para formar un triple coprecipitado.

55 El triple término coprecipitado abarca la precipitación de los tres compuestos donde los compuestos se precipitaron en sustancialmente el mismo tiempo a partir de la misma solución/dispersión. Se debe distinguir de un material formado a

ES 2 397 141 T3

partir del mezclado mecánico de los componentes, particularmente donde estos componentes se precipitaron separadamente, por ejemplo, en soluciones diferentes. La microestructura de un coprecipitado es sustancialmente diferente de un material formado a partir del mezclado mecánico de sus componentes.

5 La solución tiene preferentemente un pH de 2.5 a 6.5, con mayor preferencia de 2.5 a 5.5. Con mayor preferencia, la solución tiene un pH de 3.0 a 4.5. Aún con mayor preferencia, la solución tiene un pH de 3.8 a 4.2. Con la máxima preferencia, la solución tiene un pH de alrededor de 4.

10 La fuente de calcio es preferentemente seleccionada de uno o más de nitrato cálcico, acetato cálcico, cloruro cálcico, carbonato cálcico, alcóxido de calcio, hidróxido cálcico, silicato cálcico, sulfato de calcio, gluconato cálcico y la sal de calcio de heparina. Una sal de calcio de heparina puede derivarse de la mucosa intestinal porcina. Las sales de calcio adecuadas están comercialmente disponibles de Sigma-Aldrich Inc.

15 La fuente de fósforo es preferentemente seleccionada de uno o más de amonio dihidrógeno fosfato, diamonio hidrógeno fosfato, ácido fosfórico, disodio hidrógeno ortofosfato 2-hidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, algunas veces llamada sal de Sorensen GPR) y trimetilo fosfato, sales de metales alcalinos (por ejemplo, Na o K) de fosfato, sales de tierras alcalinas (por ejemplo, Mg o Ca) de fosfato.

20 Los glicosaminoglicanos son una familia de macromoléculas que contienen largos polisacáridos no ramificados que contienen una unidad repetitiva de disacárido. Preferentemente, el uno o más glicosaminoglicanos se seleccionan de sulfato de condroitina, sulfato de dermatina, heparina, sulfato de heparina, sulfato de queratina y ácido hialurónico. El sulfato de condroitina puede ser condroitina-4-sulfato o condroitina-6-sulfato, los cuales están disponibles de Sigma-Aldrich Inc. La condroitina-6-sulfato se puede derivar de cartílago de tiburón. El ácido hialurónico se puede derivar del cordón umbilical humano. La heparina se puede derivar de la mucosa intestinal porcina.

25 Preferentemente, en la precipitación del triple coprecipitado, la solución tiene una temperatura de 4.0 a 50°C. Con mayor preferencia, la solución tiene una temperatura de 15 a 40°C. La solución puede estar a temperatura ambiente, o sea de 20 a 30°C, y se prefiere una temperatura de 20 a 27°C. Con la máxima preferencia, la temperatura es de alrededor de 25°C.

30 La concentración de iones calcio en la solución acuosa es típicamente de 0.00025 a 1 moldm^{-3} y preferentemente de 0.001 a 1 moldm^{-3} . Donde el proceso incluye las etapas adicionales de filtración y o secado a baja temperatura, la concentración de iones calcio en la solución acuosa es con mayor preferencia de 0.05 a 0.5 moldm^{-3} (por ejemplo de 0.08 a 0.25 moldm^{-3}) y con la máxima preferencia de 0.1 a 0.5 moldm^{-3} . Donde el proceso incluye las etapas adicionales de liofilización y opcionalmente moldeo por inyección, la concentración de iones calcio en la solución acuosa es con mayor preferencia de 0.01 a 0.3 moldm^{-3} y con la máxima preferencia de 0.05 a 0.18 moldm^{-3} .

40 Preferentemente, la solución comprende iones fosfato y la concentración de iones fosfato en solución es típicamente de 0.00025 a 1 moldm^{-3} y preferentemente de 0.001 a 1 M . Donde el proceso incluye las etapas adicionales de filtración y/o secado a baja temperatura, la concentración de iones fosfato en solución es con mayor preferencia de 0.05 a 0.5 moldm^{-3} , aún con mayor preferencia 0.1 a 0.5 M , por ejemplo 0.1 a 0.35 moldm^{-3} . Donde el proceso incluye las etapas adicionales de liofilización y opcionalmente de moldeo por inyección, la concentración de iones fosfato en solución es con mayor preferencia de 0.01 a 0.3 moldm^{-3} , aún con mayor preferencia 0.05 a 0.18 M .

45 Preferentemente, la relación de colágeno por la cantidad total de uno o más glicosaminoglicanos en la solución antes de la precipitación es de 8:1 a 30:1 en peso. Con mayor preferencia, la relación de colágeno por la cantidad total de uno o más glicosaminoglicanos es de 10:1 a 12:1, y con la máxima preferencia la relación es de 11:1 a 23:2.

50 Preferentemente, la relación de colágeno por brushita en el triple coprecipitado es de 10:1 a 1:100 en peso, con mayor preferencia de 5:1 a 1:20, aún con mayor preferencia de 3:2 a 1:10, con la máxima preferencia de 3:2 a 1:4.

55 La concentración de colágeno en la solución antes de la precipitación es típicamente de 1 a 20 g/l , con mayor preferencia de 1 a 10 g/l . Donde el proceso incluye las etapas de filtración y/o secado a baja temperatura, la concentración de colágeno en la solución es con mayor preferencia de 1 a 10 g/l , aún con mayor preferencia de 1.5 a 2.5 g/l , y con la máxima preferencia 1.5 a 2.0 g/l . Donde el proceso incluye la liofilización y opcionalmente el moldeo por inyección, la concentración de colágeno en la solución antes de la precipitación es preferentemente de 5 a 20 g/l , con mayor preferencia de 5 a 12 g/l , y con la máxima preferencia de 9 a 10.5 g/l .

60 La concentración total del uno o más glicosaminoglicanos en la solución antes de la precipitación es típicamente de 0.01 a 1.5 g/l , con mayor preferencia de 0.01 a 1 g/l . Donde el proceso incluye las etapas adicionales de filtración y/o secado a baja temperatura, la concentración total del uno o más glicosaminoglicanos en la solución es con mayor preferencia de 0.03 a 1.25 g/l , aún con mayor preferencia de 0.125 a 0.25 g/l , y con la máxima preferencia de 0.13 a 0.182 g/l . Donde el proceso incluye las etapas adicionales de liofilización y opcionalmente moldeo por inyección, la

ES 2 397 141 T3

concentración total del uno o más glicosaminoglicanos en la solución es con mayor preferencia de 0.15 a 1.5 g/l, aún con mayor preferencia de 0.41 a 1.2 g/l, y con la máxima preferencia de 0.78 a 0.96 g/l.

5 Preferentemente la solución comprende iones calcio y la relación de colágeno por los iones calcio es típicamente de 1:40 a 500:1 en peso. Donde el proceso incluye las etapas adicionales de filtración y/o secado a baja temperatura, la relación de colágeno por los iones calcio es con mayor preferencia de 1:40 a 250:1, aún con mayor preferencia 1:13 a 5:4, y con la máxima preferencia 1:13 a 1:2. Donde el proceso incluye las etapas adicionales de liofilización y opcionalmente moldeado por inyección, la relación de colágeno por los iones calcio es con mayor preferencia de 1:8 a 500:1, aún con mayor preferencia 5:12 a 30:1, y con la máxima preferencia 5:5 a 5:1.

10 La precipitación se puede efectuar combinando el colágeno, la fuente de calcio, la fuente de fósforo y uno o más glicosaminoglicanos en una solución acuosa ácida y, dejando la solución reposar hasta que ocurra la precipitación, agitando la solución, usando la titulación con titulantes básicos, tales como amoníaco, adición de un agente de nucleación tal como brushita pre-fabricada, variando la velocidad de adición de la fuente de calcio, y cualquier combinación de estas técnicas.

15 Preferentemente, el proceso puede tener una etapa adicional de conversión por hidrolización de al menos parte de la brushita en el material compuesto de fosfato octacálcico.

20 El término biomaterial abarca un material que es biocompatible con un cuerpo humano o animal.

El material compuesto preferentemente comprende o consiste esencialmente de un triple coprecipitado que comprende colágeno, brushita y uno o más glicosaminoglicanos. El triple coprecipitado se puede formar por un proceso como se describe en la presente invención en relación con el primer aspecto de la presente invención.

25 Preferentemente, la etapa de hidrolización (hidrólisis) de brushita a fosfato octacálcico comprende poner en contacto el triple coprecipitado con una solución acuosa, dicha solución acuosa que está en o por encima del pH en el que el fosfato octacálcico se convierte termodinámicamente más estable que la brushita. Preferentemente, esta solución acuosa tiene un pH de 6 a 8. Con mayor preferencia, esta solución acuosa tiene un pH de 6.3 a 7. Con la máxima preferencia, esta solución acuosa tiene un pH de aproximadamente 6.65. La solución acuosa puede comprender, por ejemplo, agua desionizada cuyo pH se controla con un titulante, una solución tampón, una solución saturada con respecto a otro compuesto que contiene calcio y/o compuesto que contiene fósforo. Una solución acuosa preferida comprende ácido acético valorado hasta el pH deseado usando amoníaco.

30 Preferentemente, la etapa de hidrolización de brushita a fosfato octacálcico se realiza a una temperatura de 20 a 50 °C, con mayor preferencia de 30 a 40 °C, aún con mayor preferencia de 36 a 38 °C, con la máxima preferencia alrededor de 37 °C.

40 Preferentemente, la etapa de hidrolización de brushita a fosfato octacálcico se realiza por un tiempo de 12 a 144 horas, con mayor preferencia de 18 a 72 horas, con la máxima preferencia de 24 a 48 horas.

En una modalidad, el proceso puede incluir la conversión de al menos parte de la brushita en el material compuesto de apatita por hidrolización.

45 La apatita es una clase de minerales que comprende calcio y fosfato y tiene la fórmula general: $Ca_5(PO_4)_3(X)$, en donde X puede ser un ion que es típicamente OH^- , F^- y Cl^- , así como otros iones conocidos por aquellos con experiencia en la materia. La apatita incluye además apatitas sustituidas tales como apatitas sustituidas con silicio. La apatita incluye hidroxiapatita, el cual es un ejemplo específico de una apatita. La hidroxiapatita puede sustituirse además con silicio.

50 El material compuesto preferentemente comprende o consiste esencialmente de un triple coprecipitado que comprende colágeno, brushita y uno o más glicosaminoglicanos. El triple coprecipitado se puede formar de acuerdo con el proceso como se describe en la presente invención en relación con el primer aspecto de la presente invención.

55 Preferentemente, la etapa de hidrolización (hidrólisis) de brushita a apatita comprende poner en contacto el triple coprecipitado con una solución acuosa, dicha solución acuosa que está en o por encima del pH en el que la apatita se convierte termodinámicamente más estable que la brushita. Preferentemente, para la conversión de brushita a apatita, la solución acuosa tiene un pH de 6.65 a 9, con mayor preferencia de 7 a 8.5, aún con mayor preferencia de 7.2 a 8.5. La solución acuosa puede comprender, por ejemplo, agua desionizada cuyo pH se controla con un titulante, una solución tampón, una solución saturada con respecto a otro compuesto que contiene calcio y/o compuesto que contiene fósforo.

60 Preferentemente, la etapa de hidrolización de brushita a apatita se realiza a una temperatura de 20 a 50°C, con mayor preferencia de 30 a 40°C, aún con mayor preferencia de 36 a 38 °C, con la máxima preferencia alrededor de 37 °C.

Preferentemente, la etapa de hidrolización de brushita a apatita se realiza por un tiempo de 12 a 288 horas, con mayor preferencia de 18 a 72 horas, con la máxima preferencia de 24 a 48 horas.

5 Los métodos para aumentar la velocidad de conversión de brushita a fosfato octacálcico y/o apatita incluyen (i) aumentar la temperatura, (ii) la concentración de brushita en solución, y/o (iii) la velocidad de agitación.

10 Se puede desear producir un biomaterial de acuerdo con la presente invención que comprende tanto apatita como fosfato octacálcico. Los procesos se pueden combinar para producir un material que comprende tanto fosfato octacálcico como apatita. La brushita en el triple coprecipitado primero se puede convertir a fosfato octacálcico y después el fosfato octacálcico se puede convertir parcialmente a apatita. La conversión total, o casi total (es decir, al menos 98%), de brushita o fosfato octacálcico a apatita típicamente ocurre por hidrolización a un pH de 8.0 o más durante un período de aproximadamente 12 horas. La conversión parcial de la brushita y/o apatita en el material por lo tanto se puede efectuar por hidrolización durante un periodo de menos de 12 horas.

15 Preferentemente, la etapa de hidrolización de fosfato octacálcico a apatita se realiza a un pH de 6.65 a 10, con mayor preferencia de 7.2 a 10, aún con mayor preferencia de 8 a 9.

20 Preferentemente, la etapa de hidrolización de fosfato octacálcico a apatita se realiza a una temperatura de 20 a 50°C, con mayor preferencia de 30 a 40°C, aún con mayor preferencia de 36 a 38°C, con la máxima preferencia alrededor de 37°C.

25 Preferentemente, la etapa de hidrolización de fosfato octacálcico a apatita se realiza por un tiempo de 2 a 144 horas, con mayor preferencia de 12 a 96 horas, con la máxima preferencia de 24 a 72 horas.

30 En una modalidad, la conversión de brushita a fosfato octacálcico y/o apatita se realiza preferentemente a una temperatura de 30 a 40 grados centígrados. Con mayor preferencia, la conversión se realiza a una temperatura de 36 a 38 grados centígrados. con la máxima preferencia, la conversión se realiza a una temperatura de aproximadamente 37 grados centígrados.

35 Preferentemente, los procesos de la presente invención comprenden además la etapa de reticulación de uno o más glicosaminoglicanos y el colágeno en el triple coprecipitado. Por triple coprecipitado este incluye el triple coprecipitado que comprende colágeno, brushita y uno o más glicosaminoglicanos y derivados del coprecipitado. Los derivados incluyen el coprecipitado en donde al menos parte de la brushita se convirtió a fosfato octacálcico y/o apatita, y el coprecipitado que se formó o moldeó, o sometió a cualquier producto químico adicional o procesamiento mecánico. La reticulación se puede lograr usando cualquiera de las técnicas convencionales.

40 Preferentemente, al menos parte de la brushita se convierte a fosfato octacálcico y/o apatita, el glicosaminoglicano y colágeno se reticulan antes de la conversión de la brushita a fosfato octacálcico y/o apatita. Esta reticulación se puede efectuar sometiendo el triple coprecipitado a uno o más de radiación gamma, radiación ultravioleta, un tratamiento hidrotérmico, glicación no enzimática con un azúcar simple tal como glucosa, manosa, ribosa y sacarosa, contactando el triple coprecipitado con uno o más de glutaraldehído, etil dimetilaminopropil carbodiimida y/o ácido nordihidroguararético, o cualquier combinación de estos métodos. Estos métodos son convencionales en la técnica.

45 Preferentemente, si al menos parte de la brushita se convierte a fosfato octacálcico y/o apatita, el glicosaminoglicano y el colágeno se reticulan posterior a la conversión de la brushita a fosfato octacálcico y/o apatita. La reticulación posterior a la conversión de la brushita a apatita/fosfato octacálcico se puede efectuar por uno o más de los métodos mencionados anteriormente o un tratamiento deshidotérmico, o cualquier combinación de estos métodos. Un tratamiento hidrotérmico incluye someter un sustrato a una atmósfera de presión baja a una temperatura elevada. La temperatura en el tratamiento hidrotérmico puede ser de 95°C a 135°C. La temperatura puede ser preferentemente de 100°C a 110°C, y con la máxima preferencia de 105°C a 110°C, si se desea el completamiento del tratamiento hidrotérmico en típicamente 18 a 36 horas. La temperatura puede ser preferentemente de 120°C a 135°C, y con la máxima preferencia de 125°C a 135°C, si se desea el completamiento del tratamiento hidrotérmico en típicamente 4 a 8 horas.

55 Preferentemente, el colágeno y el glicosaminoglicano se reticulan antes o posterior a la conversión de la brushita a fosfato octacálcico y/o apatita.

60 Los procesos de la presente invención pueden comprender la etapa de conformación del biomaterial compuesto en una estructura adecuada para el uso como sustituto óseo o dental. Un paso de ese tipo puede ocurrir después de la formación del triple coprecipitado, pero antes de que pueda ocurrir cualquier conversión de la brushita o reticulación del colágeno y glicosaminoglicano.

Como alternativa, la etapa de conformación del biomaterial puede ocurrir posterior ya sea a la conversión de la brushita a apatita y/o fosfato octacálcico o reticulación del colágeno y el glicosaminoglicano.

5 Preferentemente, el material compuesto se forma usando una técnica seleccionada de (i) filtración y/o secado a baja temperatura, (ii) liofilización, (iii) moldeo por inyección y (iv) prensado en frío. La filtración y/o el secado a baja temperatura, en donde la temperatura es de 15°C a 40°C, con la máxima preferencia de 35°C a 40°C, típicamente resulta en una forma granular densa de material. La liofilización típicamente resulta en una forma porosa abierta. El moldeo por inyección resulta en una amplia variedad de formas/morfologías de un material dependiendo de la forma del colorante usado El prensado en frío típicamente resulta en una forma densa del sedimento.

10 La invención proporciona además un material precursor adecuado para la transformación en un biomaterial sintético, dicho material precursor que comprende un material compuesto que comprende colágeno, brushita, y uno o más glicosaminoglicanos. Preferentemente, el material compuesto comprende o consiste esencialmente de un triple coprecipitado que comprende colágeno, brushita, y uno o más glicosaminoglicanos. El triple coprecipitado se puede producir de acuerdo con el primer aspecto del proceso de la presente invención.

15 La presente invención proporciona además un biomaterial compuesto que comprende colágeno, brushita y uno o más glicosaminoglicanos, cuyo biomaterial es obtenible por un proceso de acuerdo con la presente invención como se describe en la presente invención.

20 La presente invención proporciona además un biomaterial compuesto que comprende colágeno, fosfato octacálcico y uno o más glicosaminoglicanos, cuyo biomaterial es obtenible por un proceso de acuerdo con la presente invención.

25 La presente invención proporciona además un biomaterial compuesto que comprende colágeno, apatita y uno o más glicosaminoglicanos, cuyo biomaterial es obtenible por un proceso de acuerdo con la presente invención.

30 La presente invención proporciona además un biomaterial compuesto que comprende un triple coprecipitado de colágeno, y uno o más glicosaminoglicanos y brushita. El material puede ser un material compuesto

35 La presente invención proporciona además un biomaterial que comprende partículas de uno o más materiales de fosfato cálcico, colágeno y uno o más glicosaminoglicanos, en donde dicho colágeno y dicho uno o más glicosaminoglicanos se reticularan y forman una matriz, dichas partículas de material de fosfato cálcico se dispersan en dicha matriz, y dicho material de fosfato cálcico se selecciona de uno o más de brushita, fosfato octacálcico y/o apatita.

40 La siguiente descripción se relaciona con todos los aspectos del biomaterial compuesto de acuerdo con la presente invención a menos que se indique de cualquier otra forma.

El colágeno y el uno o más glicosaminoglicanos preferentemente se reticularan.

45 El colágeno está preferentemente presente en el material en una cantidad de 5 a 90% en peso (seco), con mayor preferencia de 15 a 60% en peso (seco), con mayor preferencia de 20 a 40% en peso (seco).

50 Preferentemente, el uno o más glicosaminoglicanos están presentes en el material en una cantidad de 0.01 a 12% en peso (seco), con mayor preferencia de 1 a 5.5 % en peso (seco), con la máxima preferencia de 1.8 a 2.3% en peso (seco).

55 Preferentemente, si el material comprende brushita, la relación de colágeno por brushita es 10:1 a 1:100 en peso (seco), con mayor preferencia 5:1 a 1:20 en peso (seco), con la máxima preferencia 3:2 a 1:10 en peso (seco), por ejemplo 3:2 a 1:4 en peso (seco).

60 Preferentemente, si el material comprende fosfato octacálcico, la relación de colágeno por fosfato octacálcico es 10:1 a 1:100 en peso (seco), con mayor preferencia 5:1 a 1:20 en peso (seco), con la máxima preferencia 3:2 a 1:10 en peso (seco).

65 Preferentemente, la relación de colágeno por la cantidad total de uno o mas glicosaminoglicanos es de 8:1 a 30:1 en peso (seco), con mayor preferencia de 10:1 a 30:1 en peso (seco), aún con mayor preferencia 10:1 a 12:1 en peso (seco), y con la máxima preferencia 11:1 a 23:2 en peso (seco).

El biomaterial compuesto de acuerdo con la presente invención se puede usar como un sustituto de hueso o material dental.

La presente invención proporciona además un material sintético de hueso, implante óseo, injerto de hueso, sustituto de

hueso, soporte de hueso, relleno, recubrimiento o cemento que comprende un biomaterial compuesto de la presente invención. El término recubrimiento incluye cualquier recubrimiento que comprende el biomaterial o precursor de la presente invención. El recubrimiento se puede aplicar a las superficies externas o internas de los miembros protésicos, huesos, o cualquier sustrato pretendido para el uso en el cuerpo humano o animal, que incluye materiales particulados.

5 La composición de la presente invención se puede usar tanto para la reparación in vivo como ex vivo de ambos materiales biológicos mineralizados, que incluyen pero sin limitarse a los materiales óseos y dentales. Los biomateriales de la presente invención se pueden usar en el crecimiento de aloinjertos y autoinjertos.

10 El biomaterial de acuerdo con la presente invención que comprende fosfato octacálcico puede estar libre o esencialmente libre de cualquier fase del precursor brushita. Este biomaterial puede comprender menos de 2% en peso de brushita en la cantidad total de materiales de fosfato cálcico en el biomaterial.

15 El material de fosfato cálcico puede comprender o consistir esencialmente de fase pura de fosfato octacálcico o apatita. Por fase pura, esto significa preferentemente que contiene al menos 98%, con mayor preferencia al menos 99%, y con la máxima preferencia, al menos 99.5% de la fase deseada (medida por difracción de rayos X). Como alternativa, el biomaterial puede comprender una mezcla de fosfato octacálcico y apatita, dependiendo de las propiedades deseadas del biomaterial.

20 El material de la presente invención que comprende brushita se puede usar ya sea como un material precursor para preparar un biomaterial, o puede ser adecuado en sí mismo para el uso como un biomaterial.

25 Los procesos de acuerdo con la presente invención se pueden preformar usando el siguiente método secuencial, que se puede aplicar en todo o en parte, para producir biocompuestos de colágeno, uno o más glicosaminoglicanos y uno o más constituyentes de fosfato cálcico. La siguiente descripción se proporciona a modo de ejemplo y es aplicable a cualquier aspecto de los procesos de acuerdo con la presente invención.

I: Triple coprecipitación de colágeno, GAG, y la Brushita de fosfato cálcico a pH ácido

30 Esta etapa se realiza para iniciar la formación simultánea, a través de la precipitación de la solución, de los tres (o más) constituyentes del compuesto, y para controlar la relación de las tres (o más) fases respectivas. El control de las propiedades de la composición del compuesto (y, en particular, la relación colágeno: GAG: CaP) se puede lograr variando uno o más del pH, temperatura, tiempo de envejecimiento, concentración de ion calcio, concentración de ion fósforo, concentración de colágeno y concentración de GAG. El pH se puede mantener constante (usando, por ejemplo, tampones, titulación de pH-stat u otros métodos), o se deja variar. Las posibles fases secundarias (contaminante) incluyen otros fosfatos cálcicos ácidos (por ejemplo, monetita, hidrógeno fosfato cálcico) y complejos que incluyen subproductos de titulación y la adición de reactivo (por ejemplo, fosfato de amonio, nitrato de amonio). Los aditivos para ayudar la reticulación (por ejemplo, glucosa, ribosa) o para mejorar la respuesta in vivo (por ejemplo, factores de crecimiento, factores de transcripción de genes, silicio, péptidos natriuréticos) se pueden adicionar además durante esta etapa.

35

II: Formación de la forma de red

40 Esta etapa se puede realizar para producir la arquitectura deseada de la forma de material final del compuesto, con énfasis particular en el control de la arquitectura del poro. Los ejemplos de técnicas incluyen filtración y secado a baja temperatura (resultando en una forma granular densa), liofilización (resultando en una forma porosa abierta), moldeo por inyección (resultando en un amplio intervalo de formas dependiendo del tipo de colorante) y prensado en frío (resultando en una forma densa de sedimentos).

III: Reticulación Primaria

45 Esta etapa se puede realizar para asegurar preferentemente que, cuando se coloca en una solución de pH elevado, el contenido de GAG del compuesto no se escapa rápidamente, y, además, para mejorar las propiedades mecánicas y degradación del compuesto. Los ejemplos de técnicas incluyen técnicas físicas a temperatura baja (por ejemplo, irradiación gamma, radiación ultravioleta, tratamiento hidrotérmico), técnicas químicas (por ejemplo, glicación no enzimática con un azúcar simple, glutaraldehído, etil dimetilaminopropil carbodiimida, ácido nordihidroguararético), o métodos de combinación (por ejemplo glicación simultánea no enzimática e irradiación gamma). En el caso que es deseable la conversión de fosfato octacálcico (es decir, como en la etapa IV), la reticulación primaria se realiza ventajosamente a una temperatura más abajo de aproximadamente 37 °C para evitar la conversión de la fase brushita a su forma deshidratada, monetita, que es un fosfato cálcico que no se hidroliza fácilmente a fosfato octacálcico.

50

IV: Hidrólisis

5 Esta etapa se puede realizar para hidrolizar parcialmente o completamente la fase CaP a partir de brushita (fase con alta solubilidad a pH fisiológico) a fosfato octacálcico y/o apatita (fases con solubilidad inferior a pH fisiológico), y para eliminar sustancialmente cualquiera de las fases contaminantes solubles (por ejemplo, nitrato de amonio, hidrógeno fosfato cálcico). En el caso de la hidrólisis a OCP, el pH seleccionado se mantiene ventajosamente constante a aproximadamente 6.65 (usando un tampón, pH stat, u otro método), y la temperatura a aproximadamente 37 °C durante alrededor de 24-48 horas. Como fue el caso en la Etapa I, los aditivos para ayudar en la reticulación (por ejemplo, glucosa, ribosa) o para mejorar la respuesta in vivo (por ejemplo factores de crecimiento, factores de transcripción de genes, silicio, péptidos natriuréticos) se pueden adicionar además durante la etapa de hidrólisis (Etapa IV).

10 V: Reticulación secundaria

Esta etapa se puede realizar para adaptar aún más las propiedades mecánicas y de degradación del compuesto. Cualquier o todos los procedimientos de reticulación enumerados en la anterior Etapa III se pueden usar para efectuar la reticulación secundaria.

15 Los siguientes Ejemplos y las figuras adjuntas se proporcionan para ayudar aún más en la comprensión de la presente invención. Los ejemplos y figuras no deben ser considerados limitativos del alcance de la invención. Cualquier característica descrita en los Ejemplos o Figuras es aplicable a cualquier aspecto de la descripción anterior.

Ejemplo 1

20 El Ejemplo 1 es un Ejemplo del método de síntesis descrito anteriormente, ejecutado a través de la aplicación sólo de las etapas I hasta III. La coprecipitación triple se lleva a cabo a temperatura ambiente (20-25°C), a un pH de aproximadamente 3.2 (mantenido por titulación con amoníaco). En este Ejemplo, los coprecipitados se secan a 37°C y reticulan a través un tratamiento hidrotérmico. Ni la conversión hidrolítica del CaP ni la reticulación secundaria se realizan en este Ejemplo.

Materiales

25 Colágeno: Colágeno dérmico porcino reconstituido, pepsina-extraído (atelocolágeno); 85% Tipo I, 15% Tipo III; Japan Meat Packers (Osaka, Japón)

GAG: Condroitina-6-sulfato de cartílago de tiburón; sal sódica; Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos) Fuentes de calcio : (i) hidróxido cálcico; Ca(OH)₂ Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos), (ii) Nitrato cálcico; Ca(NO₃)₂·4H₂O; Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos) Fuente de fósforo : Ácido ortofosfórico ; H₃PO₄; BDH Laboratory Supplies (Poole, Reino Unido)

30

Titulante amoníaco; NH₃; BDH Laboratory Supplies (Poole, Reino Unido)

Procedimiento**Etapa I****Solución A:**

35 Ca(OH)₂ se disuelve en 0.48M H₃PO₄ a una concentración de 0.12M a temperatura ambiente, y la solución resultante se titula a pH = 3.2 usando amoníaco.

Suspensión B:

- 40
- Condroitina-6-sulfato se disuelve en agua desionizada a una concentración de 3.2g/l. Bajo constante agitación, Ca(NO₃)₂·4H₂O y Ca(OH)₂ se adicionan después a la solución de sulfato de condroitina en una relación molar nitrato:hidróxido de 1.5, para producir una suspensión con una concentración total de calcio de 2.4M.
 - 0.144g de colágeno se adiciona a 20ml de solución A, y se mezcla hasta disolverse usando un homogenizador. 4ml de suspensión B se adiciona después a la solución A bajo constante agitación.

- La agitación se continua durante 60 minutos, y controla el pH para asegurar que permanece en el intervalo de $3.15 < \text{pH} < 3.30$. La suspensión resultante se deja después envejecer durante 24 horas a temperatura ambiente.

Etapa II

- 5
- La suspensión se deja secar a 37°C en el aire durante 5 días, y el triple coprecipitado restante se lava con agua desionizada, y seca de nuevo posteriormente a 37°C durante una 24 horas adicionales.
 - El patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado resultante se muestra en la Figura 1 (radiación Cu-K(alfa)) y una imagen SEM se muestra en la Figura 2.

Etapa III

10 Los triples coprecipitados se reticulan a través del tratamiento hidrotérmico (DHT) a 105°C , bajo un vacío de 50 mTorr, durante 48 horas. Una imagen TEM del triple coprecipitado posteriormente del DHT se muestra en la Figura 3. La Figura 4 muestra el patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado posteriormente del DHT e indica que la fase de brushita se convirtió en su forma deshidrata de monetita.

Ejemplo 2

15 El Ejemplo 2 es un Ejemplo del método de síntesis descrito anteriormente, ejecutado a través de la aplicación sólo de las etapas I hasta IV. La coprecipitación triple se lleva a cabo a temperatura ambiente, y un pH de 4.0. En este Ejemplo, el control del pH se efectúa por el control cuidadoso de las concentraciones de hidróxido de calcio y nitrato de calcio - un enfoque que permite además el control de la relación de masa de brushita por colágeno más GAG en el triple coprecipitado. Los triples coprecipitados resultantes se congelan después a -20°C , se colocan bajo vacío y se calientan después para inducir la sublimación del agua en exceso (es decir hielo). La reticulación primaria se realiza usando un tratamiento con 1-etil 3-(3-dimetilo aminopropilo) carbodiimida. El triple coprecipitado seco resultante se convierte después en fosfato octacálcico a través de hidrólisis a un pH de 6.67 en aproximadamente 37°C . En este ejemplo, la reticulación secundaria no se realiza.

20

Materiales

25 Tipo I: Ácido solubilizado de tendón bovino Integra Life Sciences Plainsboro, NJ, Estados Unidos

GAG: Condroitina-6-sulfato de cartílago de tiburón; sal sódica; Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos)

30 Fuentes de calcio: (i) hidróxido cálcico; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos), y (ii) Nitrato cálcico; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos) Fuente de fósforo : Ácido ortofosfórico; H_3PO_4 ; BDH Laboratory Supplies (Poole, Reino Unido) Titulante: Ninguno

Agentes de reticulación: (i) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (=EDAC); Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos), y (ii) N-hidroxisuccinimida (=NHS); Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos)

Procedimiento

Etapa I

- 35
- Se selecciona una relación de masa objetivo de brushita por colágeno más glicosaminoglicano de 1:1.
 - La concentración de colágeno más GAG en un volumen total de reacción de 200ml se fija a 21mg/ml.
 - Usando un mapa 3-dimensional empírico de variación de pH (producido en una relación constante $[\text{Ca}^{2+}]$ por ión reactivo [P] de 1.0) con diferencia de (i) concentraciones iónicas (es decir, $[\text{Ca}^{2+}] = [\text{H}_3\text{PO}_4]$) y (ii) relaciones de nitrato de calcio:hidróxido de calcio, se identifica un locus de puntos sobre el cual el pH permanece constante a 4.0. Esto se muestra en la Figura 5 (conjuntos de combinaciones de concentración iónica y relación nitrato de calcio:hidróxido de calcio para mantener el $\text{pH} = 4.0$).
- 40
- La superposición de este locus de puntos sobre un mapa de rendimiento de masa de brushita con ejes idénticos, e identificación de su inserción con el contorno de 21 mg/ml permite el conjunto de concentraciones reactivas para las que se puede producir una suspensión de triple coprecipitado que contiene una relación de

ES 2 397 141 T3

masa 1:1 de fosfato cálcico (21mg/ml) por colágeno más GAG (21mg/ml) a pH4.0 ($[Ca^{2+}] = [H_3PO_4] = 0.1383M$; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O : Ca(OH)_2 = 0.1356$) Ver Figura 6: identificación de condiciones para la síntesis a pH 4.0 de una suspensión de triple coprecipitado que contiene una relación de masa 1:1 de fosfato cálcico por colágeno más GAG.

- 5
- 3.8644g colágeno se dispersan en 171.4ml de 0.1383M de H_3PO_4 enfriándose en un baño de hielo, mezclando durante 90 minutos a 15,000rpm, usando un homogeneizador equipado con un estator de 19mm de diámetro, para crear una dispersión del colágeno muy viscoso.
 - 0.3436g de condroitina-6-sulfato (GAG) se disuelven en 14.3ml de 0.1383M a temperatura ambiente, agitando periódicamente para dispersar disolviendo a GAG, produciendo una solución de GAG.
- 10
- Después de 90 minutos, la solución de GAG de 14.3ml se adiciona a la mezcla de dispersión de colágeno a una velocidad de aproximadamente 0.5ml/min, bajo homogeneización continua a 15,000rpm, y la dispersión resultante de colágeno muy viscoso/GAG se mezcla durante un total de 90 minutos
 - Después de mezclar por 90 minutos, 1.804g de $Ca(OH)_2$ y 0.780g de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ se adicionan a la dispersión de colágeno muy viscoso/GAG durante 30 minutos en mezcla constante a 15,000rpm, creando una suspensión de triple coprecipitado de colágeno/GAG/CaP, tiempo después unos 14.3ml adicionales de 0.1383M de H_3PO_4 se mezclan en la suspensión
- 15
- El pH de la suspensión de triple coprecipitado es aproximadamente 4.0
 - La suspensión de triple coprecipitado se deja permanecer a 25°C durante un periodo de 48 horas.

Etapa II

- 20
- La suspensión de triple coprecipitado se coloca en un congelador a 20°C y se deja solidificar durante la noche.
 - La suspensión congelada se retira después del congelador, se coloca en un vacío de aproximadamente 80mTorr, y se deja subir la temperatura a temperatura ambiente, induciendo así la sublimación del hielo de la suspensión, que se deja proceder durante 48 horas.
- 25
- El patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/brushita después de eliminación del agua en exceso (radiación Cu-K (alfa)) se muestra en la Figura 7, y se muestra una imagen SEM de la superficie de un coprecipitado en la Figura 8 (imágenes electrónicas secundarias (SE) y de dispersión retrógrada (BSE) de la superficie del triple coprecipitado con CaP: colágeno + GAG = 1:1).

Etapa III

- 30
- Después de la eliminación completa del agua en exceso, 1.25 g de triple coprecipitado seco resultante se hidrata en 40 ml de agua desionizada durante 20 minutos.
 - 20 ml de una solución 0.035M de EDAC y 0.014M de NHS se adiciona al recipiente que contiene los coprecipitados triples y agua desionizada, y los coprecipitados triples se dejan reticular durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave.
- 35
- La solución EDAC se elimina, y los coprecipitados triples se enjuagan con solución de tampón fosfato (PBS) y se dejan incubar a 37°C durante 2 horas en PBS fresco en agitación suave.
 - Después de dos horas en PBS, los coprecipitados triples se enjuagan con agua desionizada, y se dejaron incubar durante dos intervalos de 10-minutos a 37°C en agitación suave.
- 40
- Los coprecipitados triples se secan después a 37°C durante 72 horas. La Figura 9 muestra un patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/brushita después de la reticulación con EDAC (radiación Cu-K (alfa)).

Etapa IV

- Los gránulos reticulados del triple coprecipitado se colocan en 50ml de agua desionizada a 37°C, y el pH de la solución se ajusta a 6.67 usando amoníaco.
- 45
- La temperatura y el pH se mantienen constante durante 48 horas, tiempo después los coprecipitados se filtran, enjuagan en agua desionizada, y secan a 37°C en el aire.
 - Un patrón de difracción de rayos X de los coprecipitados después de la conversión a OCP se muestra en la Figura 10 (triple coprecipitado de colágeno/GAG/CaP reticulado con EDAC después de la conversión en OCP a 37°C durante 72 horas a pH 6.67, para formar un biocompuesto colágeno/GAG/OCP, por radiación Cu-K (alfa)).
- 50

Ejemplo 3

El Ejemplo 3 es un Ejemplo de método de síntesis descrito anteriormente, ejecutado a través de la aplicación de las etapas I hasta V incluida. La triple coprecipitación se lleva a cabo a temperatura ambiente, y un pH de aproximadamente 4.5. Como en el Ejemplo 2, el control de pH se efectúa por el control cuidadoso de las concentraciones de hidróxido de calcio y nitrato de calcio, sin el uso de titulantes. Los coprecipitados resultantes se congelan después a -20°C , se colocan bajo vacío y calientan después para inducir la sublimación de agua en exceso (es decir, hielo). La reticulación primaria se realiza usando un tratamiento con 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimida. El coprecipitado seco resultante se convierte después en apatita a pH 8.50, a 37°C . La reticulación secundaria se realiza usando la irradiación gamma.

10 Materiales

Tipo I: Ácido solubilizado de tendón bovino

Integra Life Sciences Plainsboro, NJ, Estados Unidos

GAG: Condroitina-6-sulfato de cartílago de tiburón; sal sódica; Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos)

15 Fuentes de calcio: (i) hidróxido cálcico; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos), y (ii) Nitrato cálcico; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos) Fuente de fósforo : Ácido ortofosfórico; H_3PO_4 ; BDH Laboratory Supplies (Poole, Reino Unido)

Titulante: Ninguno

20 Agentes de reticulación: (i) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (=EDAC); Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos) y (ii) N-hidroxisuccinimida (=NHS); Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos)

Procedimiento**Etapas I**

- Se selecciona una relación de masa objetivo de brushita por colágeno más glicosaminoglicano de 3:1.
- La concentración de colágeno más GAG en un volumen total de reacción de 200 ml se fija en 10mg/ml.
- 25 • Usando un mapa 3-dimensional, empírico de variación de pH (en una relación constante $[\text{Ca}^{2+}]$ por ión reactivo $[\text{P}]$ de 1.0) con diferencia de i) concentraciones iónicas (es decir, $[\text{Ca}^{2+}] = [\text{H}_3\text{PO}_4]$) y ii) relaciones de nitrato de calcio: hidróxido de calcio, se identifica un locus de los puntos sobre los cuales el pH se mantuvo constante a 4.5. Esto se muestra en la Figura 11 (conjunto de combinaciones de concentración iónica y relación de nitrato de calcio: hidróxido de calcio para mantener el $\text{pH} = 4.5$).
- 30 • La superposición de este locus de puntos sobre un mapa de rendimiento de masa de brushita (con ejes idénticos), y la identificación de su intersección con el contorno de 30mg/ml (es decir 3 veces la concentración de colágeno más GAG) permite el conjunto de concentraciones de reactivos para las que se puede producir una suspensión de triple coprecipitado que contiene una relación de masa de 3:1 de fosfato cálcico (30mg/ml) por colágeno más GAG (10mg/ml) a un pH de 4.5 ($[\text{Ca}^{2+}] = [\text{H}_3\text{PO}_4] = 0.1768\text{M}$; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: $\text{Ca}(\text{OH})_2 = 0.049$). Esto se muestra en la Figura 12: identificación de las condiciones a pH 4.5 para la síntesis de una suspensión de triple coprecipitado que contiene una relación de masa de 3:1 de fosfato cálcico por colágeno más GAG .
- 35 • 1.837g de colágeno se dispersan en 171.4ml de 0.1768M H_3PO_4 enfría en un baño de hielo, mezclando durante 90 minutos a 15,000 rpm, usando un homogeneizador equipado con un estator de 19 mm de diámetro, para crear una dispersión de colágeno.
- 40 • 0.163g de condroitina-6-sulfato (GAG) se disuelven en 14.3ml de 0.1768M a temperatura ambiente, agitando periódicamente para dispersar disolviendo a GAG, para producir una solución de GAG.
- Después de 90 minutos, la solución de GAG de 14.3ml se adiona a la mezcla de dispersión de colágeno a una velocidad de aproximadamente 0.5ml/min, bajo homogeneización continua a 15,000rpm, y la dispersión resultante de colágeno/GAG se mezcló durante un total de 90 minutos.
- 45 • Después de mezclar por 90 minutos, 2.498g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y 0.380g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se adicionan a la dispersión de colágeno/GAG durante 30 minutos bajo mezcla constante a 15,000rpm, creando una suspensión de triple

coprecipitado de colágeno/GAG/CaP, tiempo después unos 14.3ml adicionales de 0.1768M H₃PO₄ se adicionan a la mezcla de la suspensión.

- El pH de la suspensión de triple coprecipitado es aproximadamente de 4.5.
- La suspensión de triple coprecipitado se deja permanecer a 25 °C durante un período de 48 horas.

5 **Etapa II**

- La suspensión de triple coprecipitado se coloca en un congelador a
- 20°C y se deja congelar durante la noche.
- La suspensión congelada se retira entonces del congelador, se coloca en un vacío de aproximadamente 80mTorr, y la temperatura se deja subir a temperatura ambiente, induciendo así la sublimación del hielo de la suspensión, que se deja proceder durante 48 horas. La traza de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/brushita a continuación de la eliminación del agua en exceso (radiación Cu-K(alfa)) se muestra en la Figura 13.

Etapa III

- Después de la eliminación completa del agua en exceso, 1.25g del triple coprecipitado seco resultante se hidrata en 40 ml de agua desionizada durante 20 minutos.
- 20 ml de una solución de 0.018M de EDAC y 0.007M de NHS se adiciona al recipiente que contiene los triples coprecipitados y agua desionizada, y los triples coprecipitados se dejan reticular durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación suave.
- La solución EDAC se retira, y los triples coprecipitados se enjuagan con solución de tampón fosfato (PBS) y se dejan incubar a 37°C durante 2 horas en PBS fresco en agitación suave.
- Después de dos horas en PBS, los triples coprecipitados se enjuagan con agua desionizada, y se dejan incubar durante dos intervalos de 10 minutos a 37°C en agitación suave.
- Los triples coprecipitados se secan después a 37°C durante 72 horas. El patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/brushita a continuación de la reticulación EDAC (radiación Cu-K (alfa)) se muestra en la Figura 14.

Etapa IV

- Los gránulos reticulados del triple coprecipitado se colocan en 50ml de agua desionizada pre-saturada con respecto a la brushita a 37°C, y el pH de la solución se ajusta a 8.50 usando amoníaco.
- La temperatura y pH se mantienen constante durante 72 horas, tiempo después los coprecipitados se filtran, enjuagan en agua desionizada, y secan a 37°C en el aire. Un patrón de difracción de rayos X de los coprecipitados a continuación de la conversión en apatita se muestra en la Figura 15 (triple coprecipitado colágeno/GAG/CaP reticulado con EDAC a continuación de la conversión a 37°C en apatita durante 72 horas a pH 8.50, para formar una biocomposición de colágeno/GAG/apatita (radiación Cu-K(alfa)).

Etapa V

- 35 Los triples coprecipitados colágeno/GAG/Ap secos se someten a una dosis de irradiación gamma de 32.1kGy. La Figura 16 muestra el patrón de difracción de rayos X a continuación de la irradiación gamma (triples coprecipitados colágeno/GAG/Ap reticulados con EDAC después de la reticulación secundaria a través de la irradiación gamma).

Ejemplo 4

Materiales

- 40 Colágeno: reconstituido, pepsina-extraída de colágeno dérmico porcino (atelocolágeno); 85% en peso de Tipo I, 15% en peso de Tipo III; Japan Meat Packers (Osaka, Japón)

GAG: Condroitina-6-sulfato de cartílago de tiburón; sal sódica; Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos)

Fuentes de calcio: (i) hidróxido cálcico; Ca(OH)_2 Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos), y (ii) Nitrato cálcico; $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich Inc (St. Louis, MO, Estados Unidos) Fuente de fósforo: Ácido ortofosfórico ; H_3PO_4 ; BDH Laboratory Supplies (Poole, Reino Unido)

Titulante amoníaco; NH_3 ; BDH Laboratory Supplies (Poole, Reino Unido)

5 **Procedimiento**

Etapa I

- La solución A se preparó disolviendo el Ca(OH)_2 en 0.48M H_3PO_4 a una concentración de 0.12M a temperatura ambiente, y la solución resultante se tituló a pH de 3.2.
- 10 • La suspensión B se preparó disolviendo condroitina-6-sulfato en agua desionizada a una concentración de 3.2g/l. En constante agitación, el $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y Ca(OH)_2 se adiciona después a la solución de sulfato de condroitina en una relación molar de nitrato: hidróxido de 1.5, para producir una suspensión con una concentración total de calcio de 2.4M.
- 15 • 0.144g de colágeno se adicionaron a 20 ml de la solución A, y mezclaron usando un homogeneizador hasta disolverse. 4 ml de la suspensión B se adicionó después a la disolución A en constante agitación. La agitación se continuó durante 60 minutos, y el pH se controló para garantizar que se mantuvo en el intervalo $3.15 < \text{pH} < 3.30$. La suspensión resultante se dejó después envejecer durante 24 horas a temperatura ambiente.

Etapa II

La suspensión se dejó secar a 37°C en el aire durante 5 días, y el triple coprecipitado restante se lavó con agua desionizada, y posteriormente se secó de nuevo a 37°C durante unas 24 horas adicionales.

20 **Etapa III**

- Los coprecipitados se colocaron en ácido acético diluido ($\text{pH} = 3.2$), e irradiaron con una dosis de irradiación gamma de 30kGy. Los precipitados reticulados se retiraron después de la solución, enjuagaron y secaron a 37°C en el aire.

Etapa IV

25 Los gránulos coprecipitados, reticulados, se colocaron en 50 ml de agua desionizada a 37°C , y el pH de la solución se ajustó a 6.65 usando amoníaco. La temperatura y pH se mantuvieron constante durante 48 horas, después que los coprecipitados se filtraron, lavaron en agua desionizada, y secaron a 37°C en el aire.

Etapa V

30 Los gránulos coprecipitados reticulados, hidrolizados, se colocaron en un horno de vacío a temperatura ambiente, y aplicó un vacío de 50mTorr, después de que la temperatura se incrementó a 105°C . Después de 24 horas, se redujo la temperatura a temperatura ambiente y liberó el vacío.

35 La Figura 17 muestra el patrón de difracción de rayos X del compuesto inmediatamente a continuación de la triple coprecipitación y secado (Etapas I y II). Este patrón confirma la presente fase principal que es brushita.

La Figura 18 muestra una micrografía SEM de la estructura de los gránulos del coprecipitado a continuación después de la reticulación primaria (Etapa III). Es relevante indicar la naturaleza microestructuralmente homogénea de los gránulos.

40 La progresión de la hidrólisis de fosfato octacálcico (Etapa IV) se ilustra en el patrón de XDR de la Figura 19. La disminución progresiva de la intensidad del pico de brushita a 12.5° , y el aumento del pico principal de fosfato octacálcico (OCP) a 4.5° indica la conversión de la fase inorgánica de OCP durante un período de 48 horas.

45 Una imagen TEM del compuesto se muestra en la Figura 20. Una distribución aleatoria de cristales de fosfato cálcico de baja relación-aspecto 10-20nm dispersados en una matriz de colágeno/GAG es evidente.

Los biomateriales compuestos de la presente invención se pueden usar como un material bioabsorbible. A continuación

de la implantación, se espera que un dispositivo fabricado a partir del material pueda reabsorberse completamente, dejando sólo el tejido sano, regenerado, sin trazas restantes del propio implante.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de un material compuesto que comprende colágeno, brushita y uno o más glicosaminoglicanos, dicho proceso comprende las etapas de

5 proporcionar una solución ácida acuosa de colágeno que comprende, una fuente de calcio y una fuente de fósforo y uno o más glicosaminoglicanos, y precipitar el colágeno, la brushita y uno o más glicosaminoglicanos junto con la solución acuosa para formar un triple coprecipitado.
- 10 2. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 1, en donde la solución tiene un pH de 2.5 a 6.5, preferentemente de 2.5 a 5.5.
- 15 3. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 2, en donde la solución tiene un pH de 3 a 4.5, preferentemente de 3.8 a 4.2.
- 20 4. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente de calcio se selecciona a partir de uno o más de nitrato de calcio, acetato de calcio, cloruro de calcio, carbonato de calcio y alcóxido de calcio, hidróxido de calcio, silicato de calcio, sulfato de calcio, gluconato de calcio y sal cálcica de heparina.
- 25 5. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la fuente de fósforo se selecciona de uno o más de amonio dihidrógeno fosfato, diamonio hidrógeno fosfato, ácido fosfórico, disodio hidrógeno ortofosfato 2-hidrato y trimetilo fosfato.
- 30 6. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde uno o más glucosaminoglucanos se seleccionan de sulfato de condroitina, sulfato de dermatina, heparina, sulfato de heparina, sulfato de queratina y ácido hialurónico.
- 35 7. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución tiene una temperatura de 4 a 50°C.
- 40 8. Un procedimiento según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación de colágeno a la cantidad total de uno o más glicosaminoglicanos en la solución es de 8:1 a 30:1 en peso.
- 45 9. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución comprende iones de calcio y la relación de colágeno a iones de calcio es de 1:40 a 500:1 en peso, preferentemente de 1:40 a 250:1 en peso, con mayor preferencia de 1:13 a 5:4.
- 50 10. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación de colágeno a brushita en el coprecipitado es de 10:1 a 1:100 en peso, preferentemente de 5:1 a 1:20.
- 55 11. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución comprende iones de calcio y la concentración de iones de calcio en solución es de 0.00025 a 1 M, preferentemente de 0.001 a 1 M.
- 60 12. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución comprende iones de fosfato y la concentración de iones fosfato en la solución es de es 0.00025 a 1 M, preferentemente de 0.001 a 1 M.
13. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la concentración de colágeno en la solución es de 1.0 a 20 g/l, con mayor preferencia de 1.0 a 10 g/l.
14. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración total de uno o más glicosaminoglicanos en la solución es de 0.01 a 1.5 g/l, con mayor preferencia de 0.01 a 1 g/l.
15. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que además comprende convertir al menos parte de la brushita en el material compuesto de fosfato octacálcico por hidrolización.
16. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 15, en donde el material compuesto comprende o esencialmente consiste en un triple coprecipitado que comprende colágeno, brushita y uno o más glicosaminoglicanos.

- 5
17. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 15 o reivindicación 16, en donde la etapa de hidrolización de brushita a fosfato octacálcico comprende contactar el material compuesto con una solución acuosa, dicha solución acuosa está a o por encima del pH en el que el fosfato octacálcico se vuelve termodinámicamente más estable que la brushita.
- 10
18. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 17, en donde dicha solución acuosa tiene un pH de 6 a 8, preferentemente de 6.3 a 7.
- 15
19. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que además comprende convertir al menos parte de la brushita en el material compuesto de apatita por hidrolización.
- 20
20. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 19, en donde el material compuesto comprende o esencialmente consiste en un triple coprecipitado que comprende colágeno, brushita y uno o más glicosaminoglicanos.
- 25
21. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 19 o reivindicación 20, en donde la etapa de hidrolización de brushita a apatita comprende contactar el material compuesto con una solución acuosa, dicha solución acuosa está a o por encima del pH en el que apatita se convierte termodinámicamente más estable que la brushita.
- 30
22. Un proceso según se reivindica en la reivindicación 21, en donde dicha solución acuosa tiene un pH de 6.65 a 9, preferentemente de 7 a 8.5.
- 35
23. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, en donde la conversión de brushita a fosfato octacálcico y/o apatita se lleva a cabo a una temperatura de 20 a 50 °C, preferentemente de 30 a 40°C.
- 40
24. Un proceso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además las etapas de reticulación del colágeno y uno o más glicosaminoglicanos en el material compuesto o triple coprecipitado.
- 45
25. Un material que comprende un triple coprecipitado que comprende colágeno, brushita y uno o más glicosaminoglicanos.
- 50
26. Un material según la reivindicación 25 que es adecuado para transformar en un biomaterial sintético.
- 55
27. Un material según la reivindicación 25 en donde el material es un compuesto de biomaterial.
- 60
28. Un biomaterial compuesto como se reivindica en la reivindicación 27 que comprende colágeno, uno o más glicosaminoglicanos, y, ya sea brushita o fosfato octacálcico.
29. Un biomaterial compuesto como se reivindica en la reivindicación 28 para usar como un sustituto de hueso o material dental.
30. Un material como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, en donde el colágeno y uno o más glicosaminoglicanos se reticulan.
31. Un material como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, en donde el colágeno está presente en el material en una cantidad de 5 a 90 porcentaje en peso, preferentemente de 15 a 60 porcentaje en peso.
32. Un material como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 31, donde uno o más glicosaminoglicanos están presentes en el material en una cantidad de 0.01 a 12 porcentaje en peso, preferentemente de 1 a 5.5 porcentaje en peso.
33. Un material como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde, si el material comprende brushita, la proporción de colágeno a brushita es de 10:1 a 1:100 en peso, preferentemente de 5:1 a 1:20 en peso.
34. Un material como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, en donde, si el material comprende fosfato octacálcico, la proporción de colágeno a fosfato octacálcico es de 10:1 a 1:100 en peso, preferentemente de 5:1 a 1:20 en peso.

35. Un material como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 34, en donde la relación de colágeno a la cantidad total de uno o más glicosaminoglicanos es de 8:1 a 30:1 en peso.
- 5 36. Un material como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 35 que comprenden partículas de uno o más materiales de fosfato cálcico, colágeno y uno o más glicosaminoglicanos, en donde, dicho colágeno y dicho uno o más glicosaminoglicanos se reticular y forman una matriz, dichas partículas de material de fosfato cálcico se dispersan en dicha matriz, y dicho material de fosfato cálcico se selecciona de uno o más de brushita, fosfato octacálcico y/o apatita.
- 10 37. Un material sintético de hueso, implante óseo, injerto de hueso, sustituto de hueso, soporte de hueso, rellenedor, recubrimiento o cemento que comprende un material como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36.

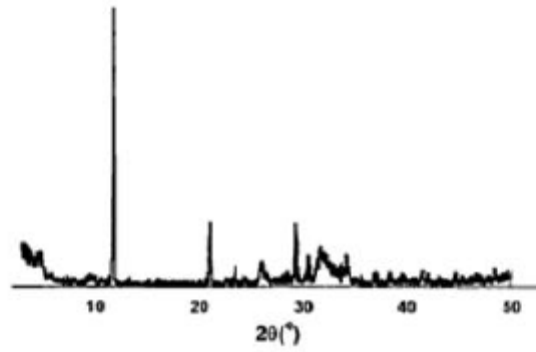


Figura 1: Patrón de XRD del compuesto a continuación de la co-precipitación (radiación Cu-K α)



Figura 2: Micrografía de SEM del triple co-precipitado.

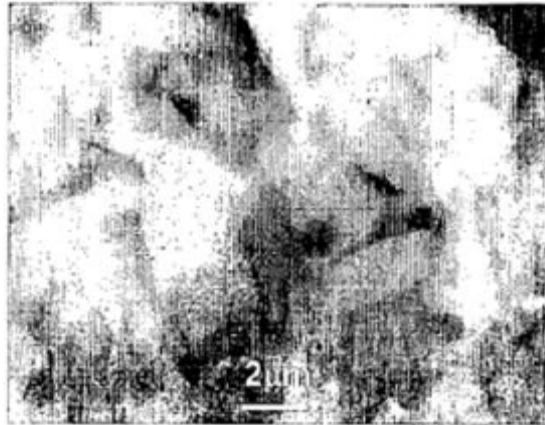


Figura 3: Micrografía de TEM del triple co-precipitado

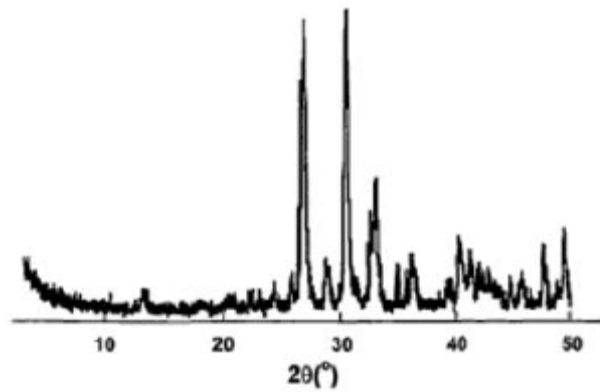


Figura 4: Patrón de XRD del compuesto a continuación del tratamiento hidrotérmico a 105°C y 50mTorr durante 48 horas, indicando que la fase brushita se convirtió a su forma deshidratada monetita.

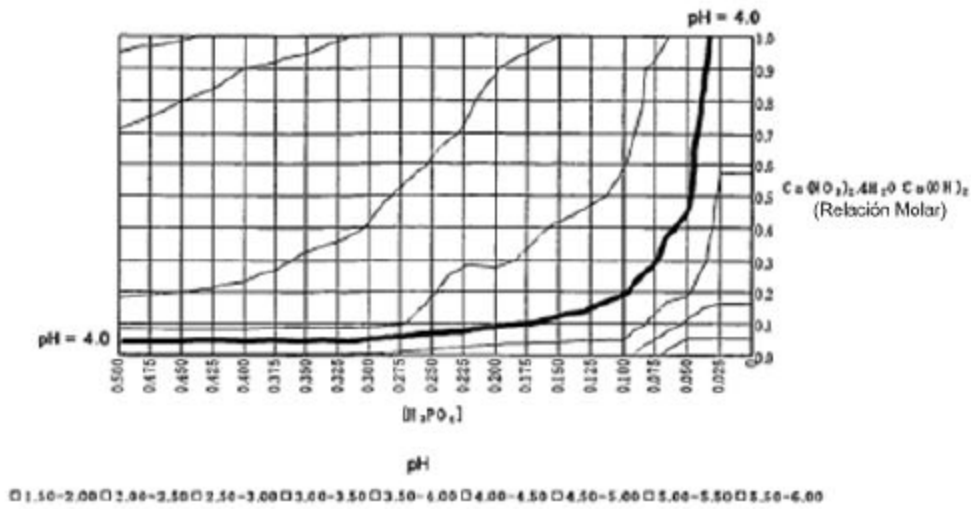


Figura 5: Conjunto de combinaciones de concentración iónica y relación de nitrato de calcio : hidróxido de calcio para mantener el pH=4.0

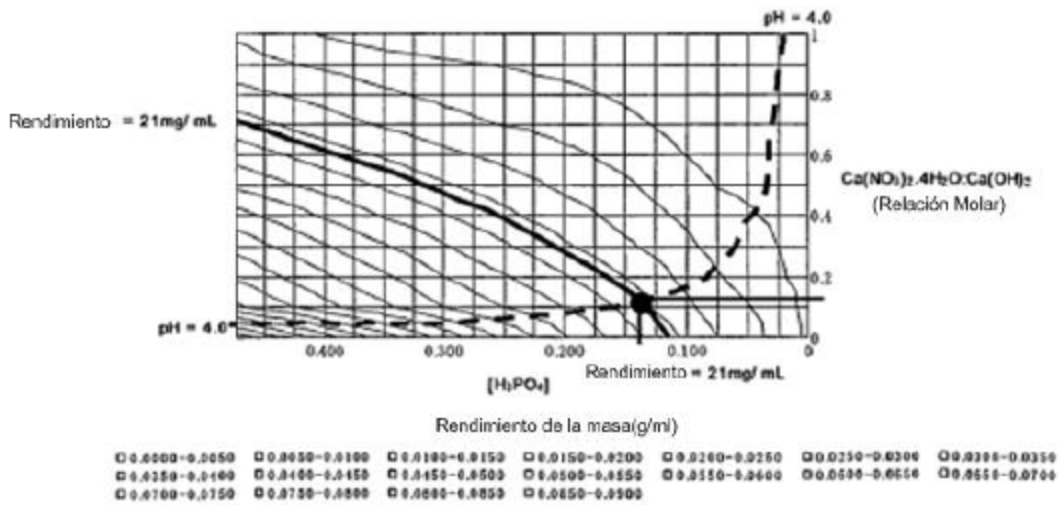


Figura 6: Identificación de condiciones para síntesis a pH 4.0 de una suspensión del triple coprecipitado que contiene una relación de masa 1:1 de fosfato cálcico a colágeno más GAG.

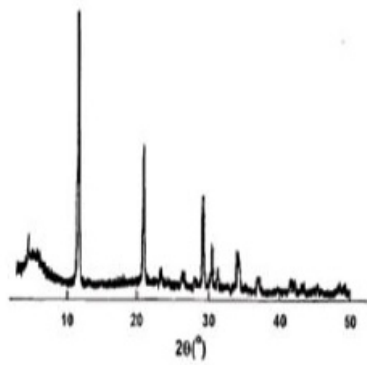


Figura 7: Patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/brushita a continuación de la eliminación del agua en exceso (radiación de Cu-K α)



Figura 8: Imágenes electrónicas secundarias (SE) y de dispersión retrógrada de la superficie del triple coprecipitado con CaP: colágeno+GAC=1:1.

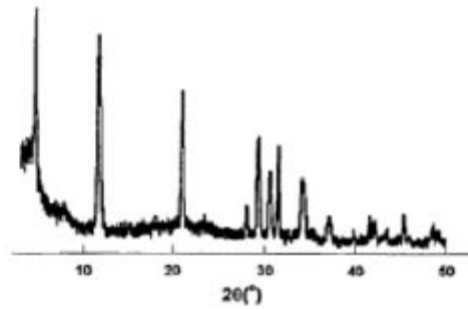


Figura 9: Patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/brushita a continuación de la reticulación con EDAC (radiación Cu-K α).

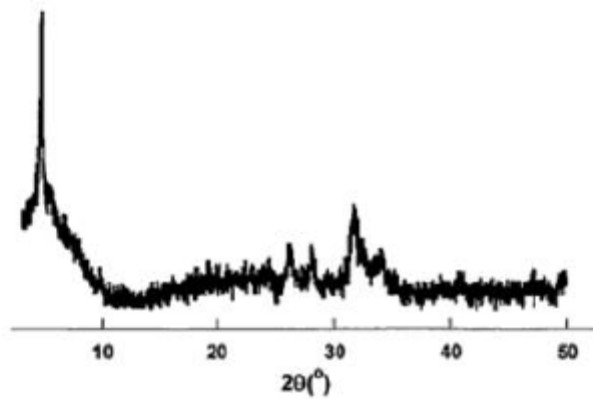


Figura 10: Patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/CaP reticulado con EDAC a continuación de la conversión a 37°C a fosfato octacálcico (OCP) durante 72 horas a pH 6.67 para formar un biocompuesto colágeno/GAG/OCP (Cu-K α radiación).

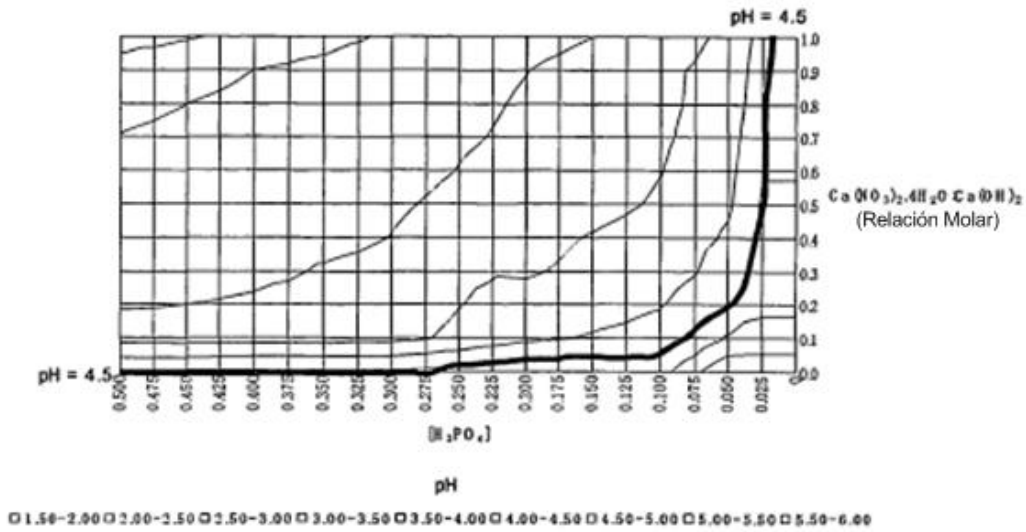


Figura 11: Conjunto de combinaciones de concentraciones iónicas y relación nitrato cálcico: hidróxido cálcico para mantener el pH=4.5

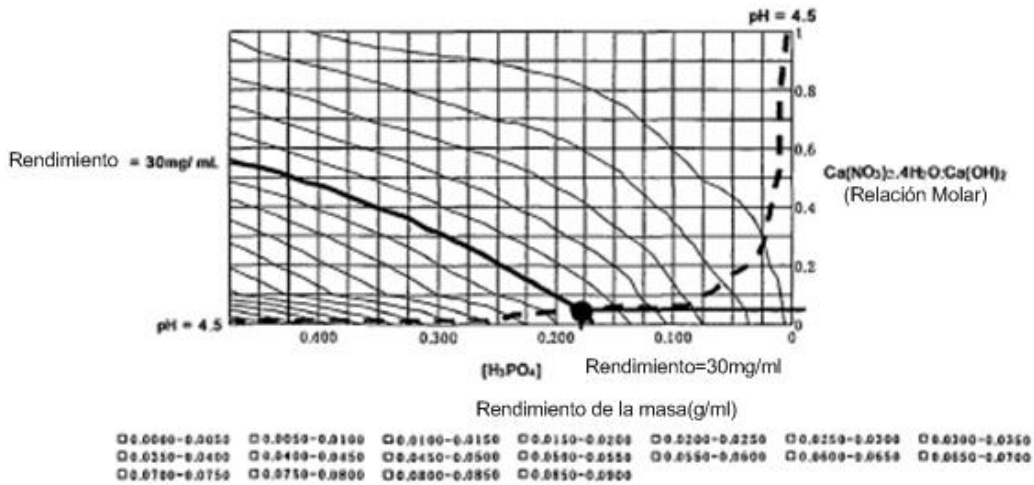


Figura 12: Identificación de las condiciones para la síntesis a pH 4.5 de una suspensión del triple coprecipitado que contiene una relación de masa 3:1 de fosfato cálcico a colágeno más GAG

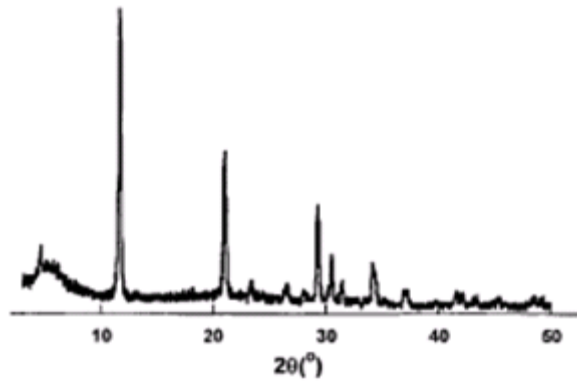


Figura 13: Patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/brushita a continuación de la eliminación del agua en exceso (radiación de $\text{Cu-K}\alpha$)

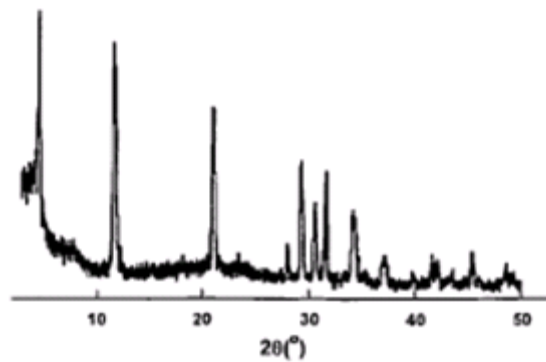


Figura 14: Patrón de difracción del triple coprecipitado colágeno/GAG/brushita a continuación de la reticulación con EDAC (radiación $\text{Cu-K}\alpha$).

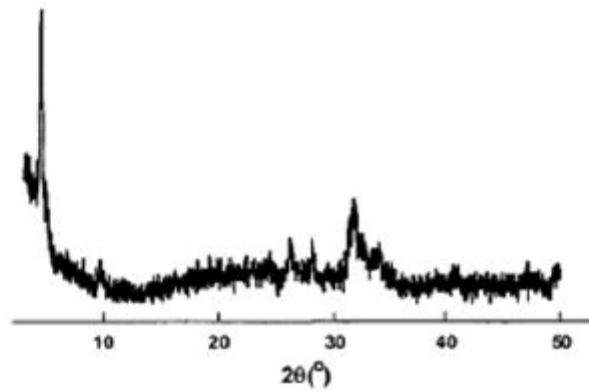


Figura 15: Patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/CaP reticulado con EDAC a continuación de la conversión a 37°C a apatita durante 72 horas a pH 8.5, para formar un biocompuesto colágeno/GAG/apatita (radiación Cu- $K\alpha$).

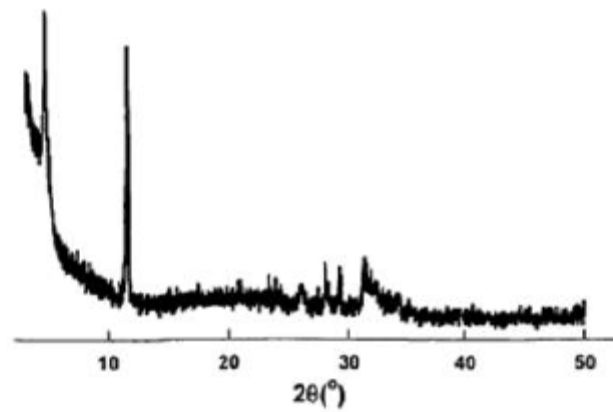


Figura 16: Patrón de difracción de rayos X del triple coprecipitado colágeno/GAG/Ap reticulado con EDAC después de la reticulación secundaria a través de la irradiación gamma .

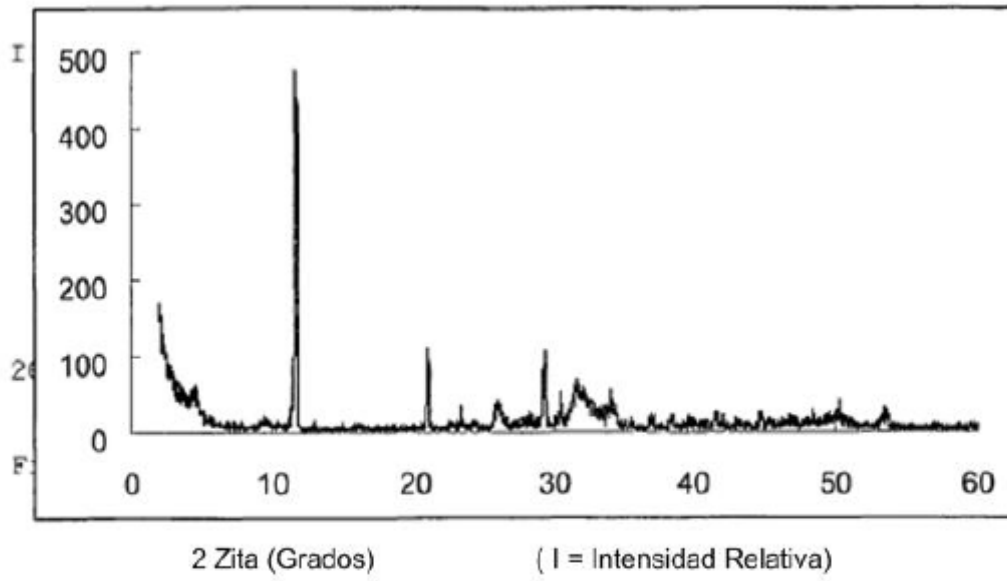


Figura 17

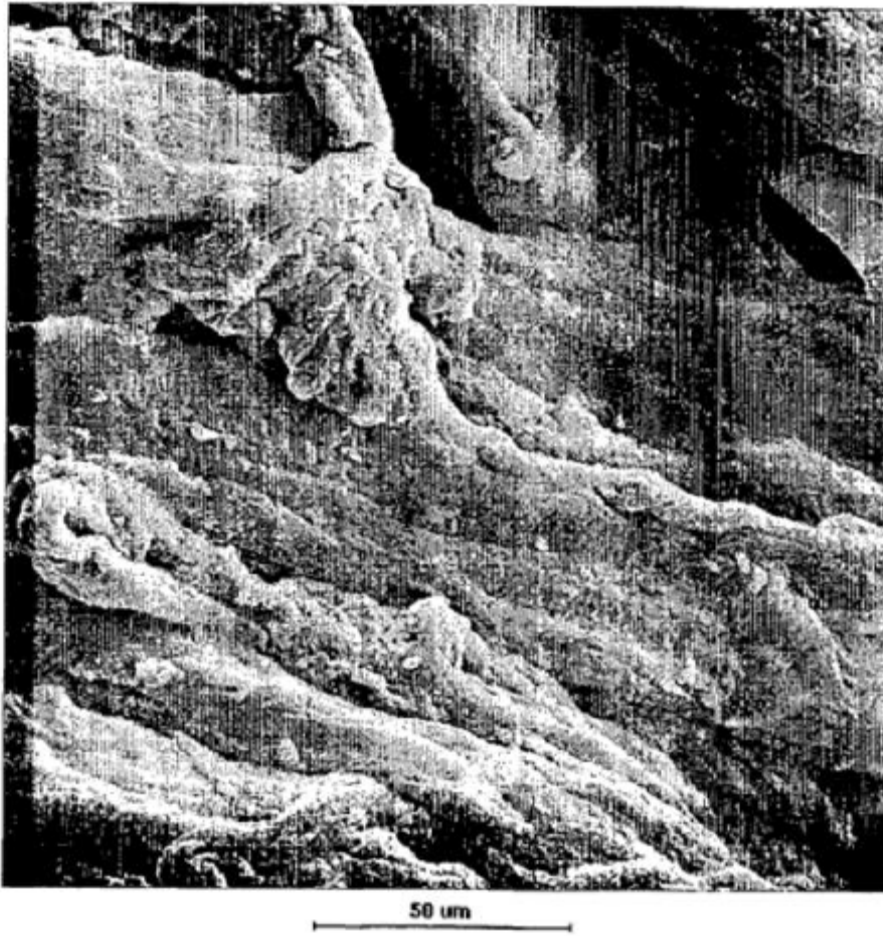


Figura 18

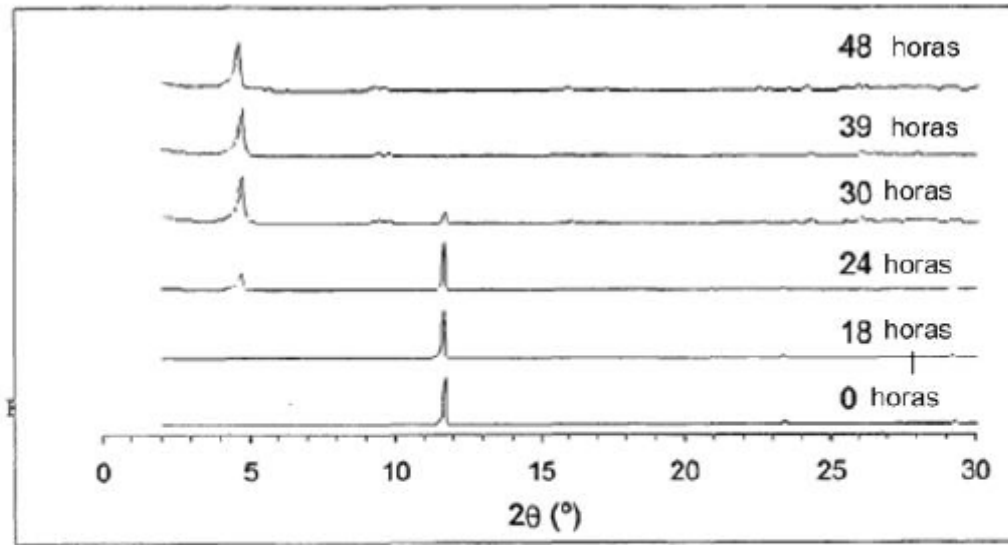


Figura 19



Figura 20