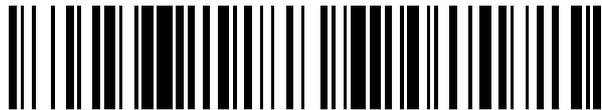


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 733**

21 Número de solicitud: 201131602

51 Int. Cl.:

A61F 2/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.05.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Campus Universitario Avda. de Elvas, s/n
06071 Badajoz ES**

72 Inventor/es:

**MIRANDA GONZÁLEZ, Pedro;
PAJARES VICENTE, Antonia;
GUIBERTEAU CABANILLAS, Fernando;
MARTÍNEZ VÁZQUEZ, Francisco Javier y
PERERA MARTÍNEZ, Hugo**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **ANDAMIAJE HÍBRIDO BIOACTIVO, MÉTODO DE FABRICACIÓN Y USO PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.**

57 Resumen:

Andamiaje híbrido bioactivo, método de fabricación y uso para ingeniería de tejido óseo.

La presente invención describe un método de fabricación de un andamiaje híbrido que comprende la obtención de una estructura biocerámica porosa bioactiva utilizando una técnica de conformado libre, y la infiltración de la misma parcial o totalmente con un polímero biodegradable obtenido por polimerización in situ de un monómero precursor del mismo. La invención describe asimismo al andamiaje híbrido obtenido mediante este procedimiento. Además la invención describe un método ex vivo para generar o regenerar un tejido óseo usando el andamiaje híbrido de la invención y uso del andamiaje híbrido, opcionalmente tratado mediante dicho método ex vivo para su uso en un tratamiento de generación o regeneración de tejido óseo.

ES 2 404 733 A1

DESCRIPCIÓN

Andamiaje híbrido bioactivo, método de fabricación y uso para ingeniería de tejido óseo

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del campo de la ingeniería tisular, y más particularmente se refiere a un método de fabricación de un andamiaje híbrido bioactivo inorgánico-orgánico que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva con geometría controlada a partir de un modelo de diseño controlado por ordenador, estando dicha estructura infiltrada parcial o totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable. La invención se refiere asimismo al andamiaje híbrido obtenible mediante este procedimiento. Además la invención se refiere a un método ex vivo para generar o regenerar un tejido óseo usando el andamiaje híbrido de la invención y al uso del andamiaje híbrido, opcionalmente tratado mediante dicho método ex vivo para su trasplante a la zona a regenerar del paciente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La pérdida de tejido óseo debido a distintas causas como son accidentes, o enfermedades graves, como por ejemplo el cáncer, necesita a menudo de un implante o sustituto óseo para la reparación de dichas lesiones óseas.

En la actualidad un nuevo enfoque del tratamiento de las lesiones óseas no trata tanto ya de “reparar” en el sentido clásico del término, sino de “estimular” los procesos celulares naturales de autoregeneración ósea, para permitir su extensión a defectos de tamaño superior al crítico, de forma que no sean necesarios los tratamientos quirúrgicos sustitutorios. Para ello se han desarrollado materiales artificiales biorresorbibles que se asemejan al hueso no sólo en sus propiedades mecánicas sino también en su capacidad de interacción con los tejidos, de manera que induzcan activamente la regeneración ósea.

Una manera de conseguir esta interacción con el tejido circundante y estimular la penetración y el crecimiento celular es utilizar materiales osteofílicos en forma de matriz porosa. Estos sustratos porosos pueden ser fabricados a partir de polímeros biodegradables como los ácidos poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA), la poli ϵ -caprolactona (PCL), etc., o a partir de biocerámicos y otros materiales inorgánicos de composición similar a la apatita del hueso natural, que pueden ser disueltos lentamente por los osteoclastos y transformados en hueso vivo. Sin embargo, el bajo módulo elástico y la rápida degradación de los biopolímeros y la elevada fragilidad de los materiales inorgánicos bioactivos limitan su aplicación a regiones del esqueleto libres de tensiones.

Uno de los motivos de la escasa resistencia mecánica de los andamiajes inorgánicos bioactivos estriba en que la porosidad debe ser interconectada y con un tamaño de interconexión mínimo, para permitir la penetración celular, así como la vascularización y difusión de nutrientes hacia el interior. Los métodos tradicionales para la fabricación de sustratos porosos (disolución y colada seguido de filtrado de partículas, espumado, secado por congelación, etc.) no permiten controlar de forma precisa la geometría, tamaño y distribución espacial de los poros y, por tanto, para lograr ese grado de interconectividad es necesario producir porosidades muy elevadas (Hutmacher DW. *Biomaterials* 2000; 21:2529-2543) en detrimento de la resistencia mecánica. Además, estos métodos tradicionales tampoco permiten reproducir las complejas formas tridimensionales de las estructuras óseas que se pretende sustituir.

Las técnicas de prototipado rápido (rapid prototyping) o conformado libre (Solid Free-form Fabrication o SFF) (Sachlos E, Czernuszka JT. *European Cells and Materials* 2003; 5:29-40 y Evans, J.R.G. *Journal of the European Ceramic Society* 2008; 28:1421-1432) resuelven estos problemas, al permitir fabricar sustratos con la estructura de poros y forma exterior deseadas, de manera reproducible y sin necesidad de mecanizado. Las tecnologías SFF, (impresión 3-D, estereolitografía, conformado por moldeo robotizado (robocasting), etc.) permiten la construcción de objetos tridimensionales complejos a partir de un modelo computacional de diseño asistido por ordenador (DAO), mediante un proceso de deposición por capas. Por lo tanto, es posible mediante las tecnologías SFF obtener altos grados de interconectividad incluso con porosidades reducidas, lo que permite mejorar significativamente las propiedades mecánicas de los andamiajes (Miranda P, Pajares A, Saiz E, Tomsia AP, Guiberteau F. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2008; 85A:218–227).

A pesar de la mejora de prestaciones mecánicas asociadas al preciso control de la arquitectura de poros proporcionado por técnicas SFF la fragilidad de estas estructuras porosas inorgánicas bioactivas persiste. Como se ha puesto de manifiesto en un trabajo previo (F.J. Martínez-Vázquez, F. H. Perera, P. Miranda, A. Pajares, F. Guiberteau. *Acta Biomaterialia*. 6, 4361-4368 (2010)), un procedimiento para paliar este problema es infiltrar estas estructuras con polímeros biodegradables, tales como el ácido poliláctico (PLA) o poliglicólico (PGA), la poli ϵ -caprolactona (PCL), etc. Sin embargo, el método de infiltración utilizado en ese trabajo requiere de altas temperaturas para la fusión de los biopolímeros, y presenta, entre otras desventajas, que imposibilita la incorporación de fármacos o biomoléculas a la composición de éstos.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

A la vista de lo expuesto la presente invención se enfrenta al problema de proporcionar un procedimiento alternativo para la obtención de estructuras porosas inorgánicas bioactivas infiltradas con polímeros biodegradables que superen al menos en parte las desventajas anteriormente mencionadas.

5 El método propuesto por la presente invención se basa en que los inventores han descubierto que es posible fabricar nuevos andamiajes híbridos parcial o totalmente infiltrados con un polímero biodegradable, en el que éste se obtiene por polimerización *in situ*. La polimerización *in situ* comprende poner en contacto una estructura biocerámica porosa bioactiva obtenida de forma previa, por cualquier técnica de conformado libre (SFF) por ejemplo mediante conformado por moldeo robotizado (robocasting), con una composición del correspondiente monómero precursor de dicho polímero biodegradable que puede asimismo contener uno o más fármacos sin que éstos se degraden ya que la polimerización *in situ* tiene lugar sin necesidad de emplear elevadas temperaturas.

10 Por tanto en un aspecto la invención se refiere a un método de fabricación de un andamiaje híbrido que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcial o totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable que comprende las siguientes etapas:

- 15
- 1) obtención de una estructura biocerámica porosa bioactiva sinterizada anhidra, fabricada utilizando una técnica de conformado libre,
 - 2) impregnación de la estructura resultante de la etapa 1) con una composición de un polímero orgánico biodegradable que comprende las etapas de
 - 20 a) Poner en contacto la estructura obtenida en la etapa anterior 1) anhidra con una composición anhidra precursora de dicho polímero orgánico biodegradable que comprende un monómero,
 - b) Adicionar un catalizador anhidro, y opcionalmente un iniciador anhidro
 - c) Calentar la mezcla resultante hasta la temperatura de reacción
 - d) opcionalmente añadir un disolvente anhidro,
 - 25 f) Polimerización y
 - g) Recuperación del andamiaje híbrido.

30 El método de la invención presenta la ventaja de que posibilita la incorporación de uno o más fármacos, incluidas biomoléculas, en la parte infiltrada del andamiaje híbrido obtenido, tales como agentes osteoinductores, por ejemplo proteínas morfogenéticas óseas humanas recombinantes (rhBMP-2, rhBMP-4 y rhBMP-7), agentes anti-inflamatorios, antibióticos, agentes anticancerígenos, agentes antivirales, hormonas, vacunas, agentes antioxidantes, etc. que mejoran substancialmente la bioactividad, acelerando el proceso de fijación del implante y el de regeneración ósea. Estos fármacos son liberados al entorno en la zona a tratar del paciente conforme progresa la biodegradación del polímero, pudiendo controlarse su velocidad de liberación mediante el control de la velocidad de degradación del polímero a través de su composición y peso molecular, así como de la propia geometría del andamiaje híbrido, que controla la difusividad de dichos fármacos.

35 Además el método de la presente invención presenta la ventaja de que permite controlar la cantidad de polímero que se infiltra de forma que puede conseguirse desde un rellenado completo de la estructura biocerámica porosa bioactiva (infiltración total) hasta un simple recubrimiento de las superficies de dicha estructura (infiltración parcial), como se muestra en las imágenes de Microscopio electrónico de barrido (SEM) ilustrativas de la Figura 1.

40 En otro aspecto la invención se relaciona por lo tanto con un andamiaje híbrido obtenible según el método de la invención que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcial o totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable. Estos andamiajes híbridos obtenibles según el método de la invención permiten que la composición de polímero biodegradable infiltrada contenga opcionalmente uno o más fármacos. Además los materiales híbridos inorgánico-orgánico permiten mejorar la tenacidad y resistencia mecánica de este tipo de estructuras tridimensionales.

45 En una realización particular el andamiaje híbrido de la invención se encuentra completamente infiltrado lo que, aunque por un lado elimina temporalmente la porosidad de la estructura tridimensional, por otro a cambio produce una mejora adicional de sus prestaciones mecánicas. Dicha falta de porosidad inicial se recupera tras la implantación del andamiaje híbrido en la zona tratada del paciente conforme el polímero se degrada.

50

En otra realización particular el andamiaje híbrido de la invención se encuentra parcialmente infiltrado (recubierto), y mantiene la estructura de poros que posibilita su siembra con células precursoras de tejido óseo antes de su implantación en un paciente.

5 Por tanto en un aspecto adicional la invención se relaciona con un método ex vivo para generar o regenerar un tejido óseo que comprende: a) sembrar células precursoras de tejido óseo en el andamiaje híbrido de la invención parcialmente recubierto, y b) incubación de dichas células en un medio de cultivo, por ejemplo, dentro de una estufa o biorreactor hasta el momento del implante.

En otro aspecto la invención se relaciona con un andamiaje híbrido que comprende células precursoras de tejido óseo. Este andamiaje se obtiene según se define en el método ex vivo.

10 En otro aspecto adicional la invención se relaciona con un andamiaje híbrido, obtenible según el método de la presente invención, que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcial o totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable y opcionalmente células precursoras de tejido óseo, para su uso en un tratamiento de generación o regeneración de tejido óseo dañado.

15 Los andamiajes híbridos de la invención pueden incorporar uno o más fármacos que estimulan los procesos naturales existentes, bien para conseguir una regeneración tisular más rápida en aquellos casos donde ésta se produce espontáneamente, bien para provocarla cuando ésta no se realiza de forma espontánea, ya sea por la magnitud de la lesión o por la escasez de los factores naturales presentes.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

20 **Figura 1:** imágenes de Microscopio electrónico de barrido (SEM) (Scanning Electron Microscope) de: **a)** una estructura biocerámica porosa bioactiva de fosfato tricálcico (TCP) obtenida mediante moldeo robotizado; **b)** dicha estructura completamente infiltrada con poli ϵ -caprolactona (PCL); y **c)** detalle de una estructura biocerámica porosa bioactiva de fosfato tricálcico (TCP) con recubrimiento de poli ϵ -caprolactona (PCL).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25 En un aspecto la invención se refiere a un método de fabricación de andamiaje híbrido, en adelante método de fabricación de la invención, que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcial o totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable que comprende las siguientes etapas:

1) obtención de una estructura biocerámica porosa bioactiva sinterizada anhidra utilizando una técnica de conformado libre,

30 2) impregnación de la estructura resultante de la etapa 1) con una composición de un polímero orgánico biodegradable que comprende las etapas de:

a) Poner en contacto la estructura obtenida en 1) con una composición anhidra precursora de dicho polímero orgánico biodegradable que comprende un monómero,

b) Adicionar un catalizador anhidro, y opcionalmente un iniciador anhidro,

c) Calentar la mezcla resultante hasta la temperatura de reacción

35 d) opcionalmente añadir un disolvente anhidro

f) Polimerización

y

g) Recuperar el andamiaje híbrido.

40 Las técnicas de prototipado rápido (rapid prototyping) o conformado libre (Solid Free-form Fabrication o SFF) que pueden ser utilizadas en el método de la presente invención se describen en Sachlos E, Czernuszka JT. European Cells and Materials 2003; 5:29-40 y Evans J.R.G. Journal of the European Ceramic Society 2008; 28:1421-1432. Estas técnicas permiten la fabricación de sustratos con la estructura de poros y forma exterior deseadas, de manera reproducible y sin necesidad de mecanizado. Entre ellas cabe citar la impresión 3-D, estereolitografía, conformado por moldeo robotizado (robocasting), etc. que permiten la construcción de objetos tridimensionales complejos a partir de un modelo computacional de diseño asistido por ordenador (DAO), mediante un proceso de deposición por capas. Por lo tanto, estas técnicas posibilitan la obtención de altos grados de interconectividad incluso con porosidades reducidas, lo que permite mejorar significativamente las propiedades mecánicas de los andamiajes (Miranda P, Pajares A, Saiz E, Tomsia AP, Guiberteau F. J. Biomed. Mater. Res. Part A. 2008; 85A:218-227).

45

En una realización particular la etapa 1) de obtención de una estructura biocerámica porosa bioactiva sinterizada anhidra se realiza utilizando la técnica de conformado libre por moldeo robotizado. Esta técnica convencional comprende las siguientes etapas:

(a) Preparación de una tinta,

5 (b) Diseño de una geometría tridimensional de la estructura inorgánica porosa bioactiva a obtener utilizando un software implementado por un ordenador,

(c) Extrusión de dicha tinta a través de una punta extrusora y deposición de la misma en un baño de aceite como barras discretas en dicha geometría tridimensional,

(d) Secado y sinterización de dicha estructura.

10 El material biocerámico utilizable para la preparación de la tinta puede ser cualquier material biocerámico convencional como por ejemplo fosfatos, sulfatos, carbonatos y silicatos cálcicos y/o magnésicos, biovidrios, etc., y sus mezclas. La técnica de conformado libre por moldeo robotizado implica la deposición robotizada de dicha tinta que consiste en una suspensión coloidal altamente concentrada de dicho material biocerámico, la cual es capaz de soportar su propio peso durante el ensamblaje gracias al control de su composición y reología. Los andamiajes
15 inorgánicos obtenidos consisten en una red tridimensional de barras de dicho material biocerámico obtenidas por extrusión de la tinta a través de una punta extrusora montada en un sistema con 3 ejes motorizados controlados por ordenador. La deposición se realiza en baño de aceite y posteriormente las estructuras se secan al aire y se sinterizan.

20 La estructura biocerámica obtenida en la etapa 1) se seca por ejemplo al aire durante un tiempo variable, típicamente de 48 horas. A continuación se sinteriza a una temperatura generalmente comprendida entre 1200 y 1300°C. La estructura anhidra sinterizada resultante se utiliza a continuación en la etapa 2). En esta etapa ésta se pone en contacto en un recipiente de reacción adecuado con una composición anhidra precursora de un polímero orgánico biodegradable.

25 Esta composición anhidra consiste en una realización particular en un monómero precursor del polímero y se prepara por simple destilación del mismo. En otra realización particular la composición comprende además de un monómero uno o más fármacos.

30 El monómero precursor del polímero orgánico biodegradable puede ser en principio cualquier monómero utilizado convencionalmente en la técnica. En una realización particular el monómero se selecciona del grupo constituido por ϵ -caprolactona, 1,5-dioxepan-2-ona, glicolida, lactida (L y D), δ -valerolactona, hidroxibutirato, β -butirolactona, hidroxivalerato, dioxanona, β -propiolactona, octanolida, undecanolida, pentadecanolida, hexadecanolida, pentadecalactona, hexadecalactona, y sus mezclas.

A continuación se añaden al recipiente de reacción un catalizador anhidro y opcionalmente un iniciador anhidro.

35 El catalizador anhidro utilizado puede ser en principio cualquier catalizador utilizado convencionalmente en la técnica. En una realización particular el catalizador se selecciona del grupo constituido por octanoato de estaño (II), terc-butóxido de potasio, terc-butóxido de litio, 1,5,7- triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno (TBD). En otra realización particular el catalizador se selecciona del grupo de las enzimas lipasas. Ejemplos ilustrativos de éstas son la enzima lipasa A, lipasa B, lipasa AYS, lipasa M, lipasa PPL, lipasa PA, lipasa PS, lipasa PF, lipasa PSL, lipasa RD, lipasa RJ y lipasa CR.

40 El término anhidro o anhidra en la presente invención se refiere a que cualquier elemento utilizado para poner en práctica el método de la invención, ya sea la estructura que se utiliza en la etapa 2), el catalizador, el iniciador, el disolvente, la composición anhidra precursora o cualquier elemento de laboratorio (recipiente de reacción, etc), presenta un contenido en agua inferior o igual a 0.005%, preferiblemente inferior o igual a 0.003%, más preferiblemente inferior o igual a 0.001%. Estos contenidos se consiguen bien por secado o bien por destilación.

45 Cualquier iniciador convencional puede utilizarse en el método de fabricación de la invención. Ejemplos ilustrativos de iniciadores son, entre otros, alcohol bencílico, 1-butanol, alcohol laurílico, ácido octanoico, butóxido de estaño (II), 4-pirenobutanol, acetilacetato de calcio, 1-pentanol, etc., y mezclas de los mismos.

50 La cantidad de catalizador y de iniciador es variable en cada caso dependiendo por ejemplo del monómero seleccionado y puede ser fácilmente determinada en cada caso por el experto en la materia. En una realización particular se añade un catalizador enzimático, por ejemplo en un 2% en peso respecto al monómero, y no se añade iniciador.

En otra realización particular se añade un catalizador no enzimático, por ejemplo en una proporción del 0.03% en peso de catalizador respecto a la cantidad de monómero. El catalizador puede añadirse por ejemplo en forma de disolución stock al 0.5% en volumen (siendo ésta una disolución, preparada previamente, del catalizador en un

disolvente apropiado, habitualmente tolueno). El iniciador se añade habitualmente en una proporción molar de 1:800 respecto al monómero, igualmente en forma de disolución stock al 0.3% en volumen.

La mezcla resultante de la etapa b) se calienta hasta la temperatura de reacción, que varía en función, por ejemplo, del monómero seleccionado, y del catalizador seleccionado. A continuación opcionalmente se añade un disolvente anhidro.

A continuación tiene lugar en atmósfera inerte y condiciones anhidras la polimerización.

Los inventores han podido observar que cuando no se utiliza disolvente en el método de fabricación de la invención se obtiene una infiltración total de la estructura de modo que los poros resultan totalmente rellenos de una composición de polímero como se muestra en la imagen SEM de la Figura 1 b).

Por tanto en una realización particular el método de la invención no comprende la adición de un disolvente anhidro.

Por el contrario cuando se utiliza disolvente anhidro se obtiene una infiltración parcial de la estructura que da lugar a un recubrimiento de las superficies de dicha estructura como se muestra en las imágenes SEM de la Figura 1 c).

Por tanto en una realización particular el método de la invención comprende la etapa d) de adición de un disolvente anhidro y una etapa posterior de evaporación del mismo después de la etapa f) de polimerización.

En una realización particular el disolvente anhidro es tolueno. En otra realización particular el tolueno anhidro se incorpora en una proporción en volumen monómero: tolueno anhidro comprendida entre 1:1 y 1:2.

La temperatura de reacción alcanzada por calentamiento en la etapa c) es variable y está generalmente comprendida entre 20 y 200 °C. La temperatura de reacción alcanzada varía en función por ejemplo del tipo de catalizador y disolvente en su caso utilizado y de la incorporación en su caso en la composición a polimerizar de fármacos. Se ha observado que en general temperaturas de entre 20° C y 90 °C y más concretamente entre 60°C y 90 °C son adecuadas para las reacciones de polimerización catalizadas enzimáticamente. Temperaturas comprendidas entre 130 y 170 °C son adecuadas para las reacciones de polimerización con catalizadores no enzimáticos.

Así en una realización particular la temperatura de reacción alcanzada por calentamiento en la etapa c) está comprendida entre 20° C y 90 °C, más particularmente entre 60 y 90 °C.

En otra realización particular la temperatura de reacción alcanzada por calentamiento en la etapa c) está comprendida entre 130 y 170 °C.

En otra realización preferente la temperatura de reacción alcanzada por calentamiento en la etapa c) está comprendida entre 20° C y 90 °C, y la composición polimérica comprende un fármaco o más. Esta temperatura facilita la incorporación de fármacos.

En el método de fabricación de la invención la polimerización in situ en el recipiente de reacción transcurre bajo atmósfera inerte durante un tiempo variable que puede estar comprendido entre amplios márgenes. Generalmente el tiempo de polimerización puede variar entre 1 minuto y 1 mes. En una realización preferente el tiempo está comprendido entre 24 y 72 h ya que se ha visto que la reacción de polimerización es en general más eficiente en este caso. Terminada la polimerización el andamiaje híbrido obtenido se recupera bien rompiendo el recipiente de reacción o bien extrayéndolo del mismo y separándolo del resto de los componentes del medio de reacción, y en su caso del disolvente, por medios convencionales.

Como se ha mencionado anteriormente la composición anhidra precursora del polímero orgánico biodegradable comprende además un fármaco o más según una realización particular. En este caso dicha composición se prepara añadiendo a la mezcla el fármaco, ya sea en estado puro o en forma de disolución apropiada, antes de calentarla hasta la temperatura de reacción.

En principio cualquier fármaco, incluyendo biomoléculas, puede ser incorporado, preferentemente aquellos que no sufran modificaciones sustanciales en las condiciones del método de fabricación de la invención y permanezcan activos. Fármaco en el contexto de la presente invención debe entenderse de la forma más amplia posible es decir, se refiere a "toda sustancia química utilizada en la prevención, diagnóstico, tratamiento, mitigación y cura de una enfermedad o condición; para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado; o para modificar condiciones fisiológicas con fines específicos". En el contexto de la invención se considera que fármaco engloba las biomoléculas. Por biomolécula debe entenderse "cualquier molécula producida naturalmente por un organismo vivo, incluidas grandes moléculas poliméricas como las proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos, pero también pequeñas como los metabolitos".

Ejemplos de fármacos útiles en la presente invención para su incorporación en la parte infiltrada del andamiaje híbrido son por ejemplo agentes osteoinductores, por ejemplo proteínas morfogenéticas óseas humanas

recombinantes (rhBMP-2, rhBMP-4 y rhBMP-7), agentes anti-inflamatorios, antibióticos, agentes anticancerígenos, agentes antivirales, hormonas, vacunas, agentes antioxidantes, etc. que mejoran substancialmente la bioactividad, acelerando el proceso de fijación del implante y el de regeneración ósea. Los fármacos pueden ser liberados al entorno en la zona a tratar del paciente conforme progresa la biodegradación del polímero, pudiendo controlarse su velocidad de liberación mediante el control de la degradación del polímero a través de su composición y peso molecular, así como de la propia geometría del andamiaje híbrido, que controla la difusividad de dichos agentes.

En otro aspecto la invención se relaciona con un andamiaje híbrido obtenido mediante el método de fabricación de la invención. Este andamiaje híbrido, en adelante andamiaje, de la invención comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcial o totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable. En este sentido cabe mencionar que una ventaja del método de la presente invención se refiere a que permite controlar la cantidad de polímero infiltrada. De este modo se puede conseguirse un relleno completo de la estructura biocerámica porosa bioactiva (infiltración total) o un recubrimiento de las superficies de dicha estructura (infiltración parcial o recubrimiento), como se muestra en las micrografías electrónicas de barrido (SEM) ilustrativas de ejemplo de la Figura 1.

Los recubrimientos obtenidos con el método de la invención pueden variar desde espesores iguales o inferiores a 1 micrómetro hasta gruesas capas de decenas o centenares de micras, que bloquean parcialmente los poros macroscópicos prediseñados de la estructura cerámica.

En una realización particular el andamiaje de la invención comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcialmente por una composición de polímero orgánico biodegradable. Esta infiltración parcial se obtiene mediante el método de fabricación cuando comprende la etapa de adición de un disolvente anhidro.

En otra realización particular el andamiaje de la invención comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable obtenida mediante el método de fabricación sin adición de disolvente anhidro.

En otro aspecto la invención se relaciona con un método ex vivo para generar o regenerar un tejido óseo que comprende:

- a) sembrar células precursoras de tejido óseo en el andamiaje híbrido de la invención parcialmente infiltrado,
- b) incubación de dichas células en un medio de cultivo dentro de una estufa o biorreactor hasta el momento del implante.

En otro aspecto la invención se refiere a un andamiaje híbrido según se ha definido anteriormente que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcialmente por una composición de polímero orgánico biodegradable el cual comprende, además, células precursoras de tejido óseo.

El andamiaje híbrido de la presente invención permite abordar con éxito la regeneración de tejido óseo cumpliendo, en mayor o menor medida, los requisitos necesarios: es capaz de (i) ser activado con agentes osteoinductores de forma que no se pierdan rápidamente tras la implantación, (ii) facilita la adherencia y proliferación celular, (iii) modifica su velocidad de biodegradación, en función de las necesidades de la localización anatómica del mismo, (iv) colabora en el proceso de mineralización mediante el aporte de grupos calcio y fosfato y (v) resiste las tensiones mecánicas inherentes a la función ósea que debe sustituir durante el proceso regenerativo.

Finalmente por tanto en un aspecto adicional la invención se refiere a un andamiaje híbrido según se ha definido anteriormente para su uso en un tratamiento de generación o regeneración de tejido óseo dañado.

A continuación se presentan ejemplos ilustrativos de la invención que se exponen para una mejor comprensión de la invención y en ningún caso deben considerarse una limitación del alcance de la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Obtención de un andamiaje híbrido de hidroxiapatita completamente infiltrado con ácido poliláctico

Se preparó un andamiaje de hidroxiapatita fabricado por moldeo robotizado usando una pasta cerámica con un contenido en fase cerámica del 45% y unas dimensiones exteriores de 17X17 mm y 75 capas de altura. Los cilindros cerámicos se extruyeron por una punta cónica de 250 micras de diámetro, siendo la distancia de separación entre ellos de 200 micras. Las estructuras, una vez construidas, se sacaron del baño de aceite, se secaron al aire durante 48 horas y se sinterizaron a 1300 °C durante 1 hora. A continuación, se colocaron en un matraz de reacción de 50 mL, junto con una barra magnética, y 10 mg de lactida (monómero). Se introdujo el

matraz en un horno a 40°C con una presión de 100 Pa y se mantuvo en estas condiciones durante 48 horas. Posteriormente se abrió el horno introduciendo previamente una atmósfera de nitrógeno, y se selló el matraz con un septum. Se introdujo en un baño de aceite a 140 °C provisto de un agitador magnético y, una vez fundido el monómero, se añadieron 0.5 mL de disolución stock de octanoato de estaño al 0.5% en volumen y 0.5 mL de disolución stock de alcohol bencílico al 0.3%, mediante jeringa. La mezcla de reacción se mantuvo a esta temperatura durante 72 horas. A continuación se rompió el matraz de reacción, y se separó el andamiaje infiltrado del polímero sobrante utilizando una cortadora automática. El resultado fue un andamiaje híbrido de hidroxiapatita completamente infiltrado con ácido poliláctico (PLA).

Ejemplo 2: obtención de un andamiaje híbrido de fosfato tricálcico recubierto con una película de policaprolactona

Se preparó un andamiaje de fosfato tricálcico fabricado por moldeo robotizado con un contenido en fase cerámica del 40% y unas dimensiones exteriores de 10X15 mm y 62 capas de altura. Los cilindros cerámicos se extruyeron por una punta cónica de 200 micras de diámetro, y la distancia de separación entre ellos fue de 200 micras. Las estructuras se sacaron del baño de aceite, se secaron al aire durante 48 horas y se sinterizaron a 1200 °C durante 2 horas. A continuación, se coloca cada estructura en un matraz de 100 mL, junto con una barra magnética, y 20 mL de ϵ -caprolactona previamente destilada y se añadieron 400 mg de enzima *Candida Antartica* Lipasa B. Se introdujo el matraz en un horno a 40°C con una presión de 100 Pa y se mantuvo en estas condiciones durante 48 horas. Posteriormente se abrió el horno introduciendo previamente una atmósfera de nitrógeno, y se selló el matraz con un septum. Se introdujo en un baño de aceite a 60 °C provisto de un agitador magnético y se añadieron 40 mL de tolueno seco mediante jeringa. La mezcla de reacción se mantuvo durante 72 horas a la temperatura mencionada. A continuación, se retiró el andamiaje con unas pinzas y se colocó en un horno a 50 °C y 100 Pa para evaporar el disolvente. Transcurridas al menos 24 horas se extrae la estructura, y se obtuvo un andamiaje de fosfato tricálcico recubierto con una película de poli ϵ -caprolactona.

REIVINDICACIONES

1. Método de fabricación de andamiaje híbrido que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcial o totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable que comprende las siguientes etapas:
- 5 1) obtención de una estructura biocerámica porosa bioactiva sinterizada anhidra utilizando una técnica de conformado libre,
- 2) impregnación de la estructura resultante de la etapa 1) con una composición de un polímero orgánico biodegradable que comprende las etapas de:
- 10 a) Poner en contacto la estructura obtenida en 1) con una composición anhidra precursora de dicho polímero orgánico biodegradable que comprende un monómero,
- b) Adicionar un catalizador anhidro, y opcionalmente un iniciador anhidro,
- c) Calentar la mezcla resultante hasta la temperatura de reacción
- d) opcionalmente añadir un disolvente anhidro
- f) Polimerización
- 15 y
- g) Recuperar el andamiaje híbrido.
2. Método de fabricación de andamiaje híbrido según la reivindicación 1 en el que el monómero precursor del polímero orgánico biodegradable se selecciona del grupo constituido por ϵ -caprolactona, 1,5-dioxepan-2-ona, glicolida, lactida (L y D), δ -valerolactona, hidroxibutirato, β -butirolactona, hidroxivalerato, dioxanona, β -propiolactona, octanolida, undecanolida, pentadecanolida, hexadecanolida, pentadecalactona, hexadecalactona, y sus mezclas.
- 20 3. Método de fabricación de andamiaje híbrido según la reivindicación 1 o 2 en el que el catalizador se selecciona del grupo constituido por octanoato de estaño (II), terc-butóxido de potasio, terc-butóxido de litio, 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno y sus mezclas.
4. Método de fabricación de andamiaje híbrido según la reivindicación 1 o 2 en el que el catalizador se selecciona del grupo constituido por enzimas lipasas.
- 25 5. Método de fabricación de andamiaje híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la etapa d) de adición de un disolvente anhidro y una etapa posterior de evaporación del mismo después de la etapa f) de polimerización.
6. Método de fabricación de andamiaje híbrido según la reivindicación 5, en el que el disolvente anhidro es tolueno.
- 30 7. Método de fabricación de andamiaje híbrido según la reivindicación 6, en el que el tolueno anhidro se incorpora en una proporción en volumen monómero: tolueno anhidro comprendida entre 1:1 y 1:2.
8. Método de fabricación de andamiaje híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la temperatura de reacción alcanzada por calentamiento en la etapa c) está comprendida entre 20 y 200 °C .
- 35 9. Método de fabricación de andamiaje híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la polimerización in situ transcurre durante un tiempo comprendido entre 1 minuto y 1 mes, preferentemente entre 24 y 72 horas.
10. Método de fabricación de andamiaje híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la composición anhidra precursora de dicho polímero orgánico biodegradable comprende además un fármaco.
- 40 11. Método de fabricación de andamiaje híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la etapa 1) de obtención de una estructura biocerámica porosa bioactiva sinterizada anhidra se realiza utilizando la técnica de conformado libre por moldeo robotizado que comprende las siguientes etapas:
- (a) Preparación de una tinta,
- (b) Diseño de una geometría tridimensional de la estructura inorgánica porosa bioactiva a obtener utilizando un software implementado por un ordenador
- 45 (c) Extrusión de dicha tinta a través de una punta extrusora y deposición de la misma en un baño de aceite como barras discretas en dicha geometría tridimensional,

(d) Secado y sinterización de dicha estructura.

12. Andamiaje híbrido obtenido mediante el método de fabricación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcial o totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable.

5 13. Andamiaje híbrido según la reivindicación 12, que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada parcialmente por una composición de polímero orgánico biodegradable obtenida mediante el método de fabricación que comprende la etapa de adición de un disolvente anhidro.

10 14. Andamiaje híbrido según la reivindicación 13, que comprende una estructura biocerámica porosa bioactiva infiltrada totalmente por una composición de polímero orgánico biodegradable obtenida mediante el método de fabricación sin adición de disolvente anhidro.

15. Método ex vivo para generar o regenerar un tejido óseo que comprende:

a) sembrar células precursoras de tejido óseo en el andamiaje híbrido de la reivindicación 13;

b) incubación de dichas células en un medio de cultivo dentro de una estufa o biorreactor hasta el momento del implante.

15 16. Andamiaje híbrido según la reivindicación 13, que comprende además células precursoras de tejido óseo.

17. Andamiaje híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, o 16, para su uso en un tratamiento de generación o regeneración de tejido óseo dañado.

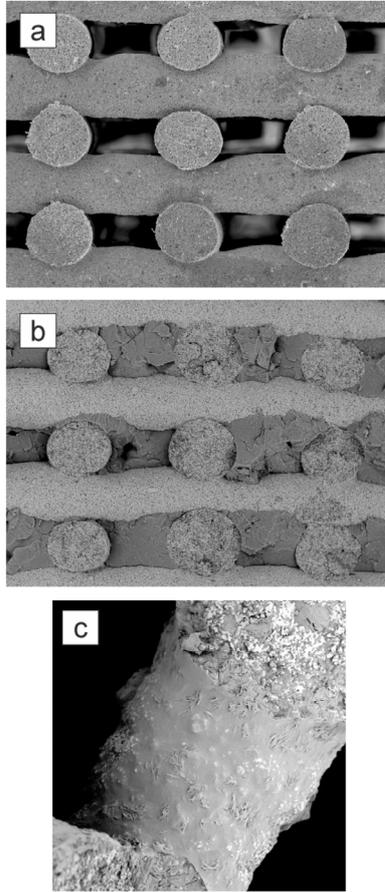


FIG. 1



- ②① N.º solicitud: 201131602
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.10.2011
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61F2/28** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PEROGLIO et al. Toughening of bio-ceramics scaffolds by polymer coating. JOURNAL OF THE EUROPEAN CERAMIC SOCIETY, 09.02.2007 VOL: 27 No: 7 Pags: 2679-2685 ISSN 0955-2219 Doi: doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2006.10.016.	1-17
A	KR 100778071B B1 (UNIV SOONCHUNHYANG IND ACAD CO) 28.11.2007, (resumen) BASE DE DATOS EPODOC [en línea], Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 15.02.2013].	1-17
A	US 2010324677 A1 (ZREIQAT HALA et al.) 23.12.2010, todo el documento.	1-17
A	WO 2011123110 A1 (OH DANIEL SUNHO et al.) 06.10.2011, todo el documento.	1-17
A	WO 2009148553 A2 (WARSAW ORTHOPEDIC INC et al.) 10.12.2009, todo el documento.	1-17
A	WO 2008025122 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA et al.) 06.03.2008, todo el documento.	1-17
A	WO 03026714 A1 (MILLENIUM BIOLOGIX INC et al.) 03.04.2003, todo el documento.	1-17
A	WO 0215881 A2 (DYTECH CORP LTD et al.) 28.02.2002, todo el documento.	1-17
A	US 2001016353 A1 (JANAS VICTOR F et al.) 23.08.2001, todo el documento.	1-17
A	US 5714103 A (BAUER JOERG et al.) 03.02.1998, todo el documento.	11

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
25.02.2013

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

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

A61F

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

INVENES, EPODOC, WPI, CA.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SI
	Reivindicaciones	NO

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	PEROGLIO et al. Toughening of bio-ceramics scaffolds by polymer coating. JOURNAL OF THE EUROPEAN CERAMIC SOCIETY, 09.02.2007 VOL: 27 No: 7 Pags: 2679-2685 ISSN 0955-2219 Doi: doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2006.10.016.	09.02.2007
D02	KR 100778071B B1 (UNIV SOONCHUNHYANG IND ACAD CO)	28.11.2007
D03	US 2010324677 A1 (ZREIQAT HALA et al.)	23.12.2010
D04	WO 2011123110 A1 (OH DANIEL SUNHO et al.)	06.10.2011
D05	WO 2009148553 A2 (WARSAW ORTHOPEDIC INC et al.)	10.12.2009
D06	WO 2008025122 A1 (UNIV BRITISH COLUMBIA et al.)	06.03.2008
D07	WO 03026714 A1 (MILLENIUM BIOLOGIX INC et al.)	03.04.2003
D08	WO 0215881 A2 (DYTECH CORP LTD et al.)	28.02.2002
D09	US 2001016353 A1 (JANAS VICTOR F et al.)	23.08.2001
D10	US 5714103 A (BAUER JOERG et al.)	03.02.1998

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

La solicitud reivindica un procedimiento para fabricar un andamiaje híbrido, dentro del campo de la ingeniería tisular, que comprende una estructura bio-cerámica porosa bio-activa infiltrada por un polímero orgánico biodegradable. El procedimiento incluye la obtención de la estructura bio-cerámica sinterizada mediante una técnica de conformado libre; poner en contacto dicha estructura con un precursor del polímero orgánico; adición de un catalizador anhidro; calentamiento de la mezcla hasta alcanzar la temperatura de reacción; polimerizar y recuperar el andamiaje híbrido (bio-cerámica/polímero orgánico).

La idea que subyace en el objeto de la invención, no es tanto sustituir tejido óseo dañado por el andamiaje híbrido, sino favorecer la regeneración de dicho tejido mediante el implante de este andamiaje. De hecho, se considera la posibilidad de añadir a dicho andamiaje principios activos que estimulen la formación de nuevo tejido vivo al tiempo que se produce la paulatina resorción de aquél. Incluso en la reivindicación 15 se reivindica la posibilidad de sembrar células precursoras de tejido óseo en la estructura de la invención con el fin de generar o regenerar tejido óseo.

D01-D10 representan el estado de la técnica anterior. Se refieren a métodos para fabricar andamiajes de cerámica recubiertos o infiltrados por polímeros. Sin embargo, se encuentran alejados de la invención reivindicada en la solicitud tanto en la generación del andamiaje como en la composición de los elementos. No se considera que anticipen el contenido de la solicitud. Por otro lado, no parece obvio que a partir de lo revelado en D01-D10, y en combinación con lo ya conocido en el estado de la técnica, se pueda llegar a lo reivindicado en la solicitud.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-17 cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986, y el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/ de 1986.