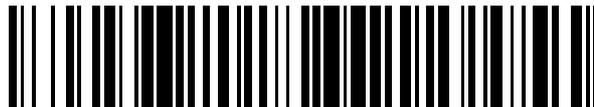


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 896**

51 Int. Cl.:

A61L 27/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009 E 09784440 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2303345**

54 Título: **Sustituto óseo, y procedimiento para su preparación**

30 Prioridad:

30.06.2008 FR 0803663

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
(33.3%)
4, Place Jussieu
75005 Paris, FR;
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
(33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**NASSIF, NADINE;
GOBEAUX, FRÉDÉRIC;
GIRAUD GUILLE, MARIE MADELEINE y
MOSSER, GERVAISE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 509 896 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

Sustituto óseo, y procedimiento para su preparación.

5 La presente invención se refiere a un sustituto óseo y a un procedimiento para su preparación.

10 El hueso es un material híbrido constituido principalmente por unas células, el colágeno de tipo I que constituye una trama orgánica proteica y una fase mineral constituida por cristales de hidroxiapatita de tamaño nanométrico. Esta asociación orgánico/mineral a gran escala en tres dimensiones confiere al mismo tiempo la elasticidad y la dureza del tejido óseo, permitiéndole así resistir a las fuerzas que le son aplicadas. El hueso es por lo tanto duro, denso y muy resistente.

15 Se ha propuesto por Weiner & Wagner (Ann. Rev. Mater. Sci. 28, 271-298, 1998) una descripción de una organización jerarquizada a diferentes escalas, que se descompone en siete niveles descritos como sigue y que están ilustrados por la figura 1 adjunta:

- 20 - Nivel 1 (figura 1a): los dos componentes principales de base constitutivos del hueso, es decir las plaquetas de hidroxiapatita y las fibrillas estriadas de colágeno, constituyen el primer nivel jerárquico de organización. Se trata del nivel más bajo de organización, a escala del nanómetro. La fase apatita está caracterizada en particular por la presencia de planos inter-reticulares característicos tales como (002) y (300). Los cristales de apatita, a este nivel de organización, no poseen ninguna orientación particular. Las fibrillas de colágeno están caracterizadas por una estriación periódica visible en microscopio electrónico y que resultan del ensamblaje de las moléculas de colágeno I que induce un desplazamiento periódico de 67 nm;
- 25 - Nivel 2 (figura 1b): la coalineación de las plaquetas de hidroxiapatita según su eje *c* a lo largo del eje principal de las fibrillas estriadas de colágeno constituye el segundo nivel, es decir que los planos inter-reticulares (002) de la apatita están orientados perpendicularmente al eje principal de las fibrillas y por lo tanto, según la periodicidad axial (es decir según las estriaciones) de las fibrillas de colágeno (estriación = 67 nm). Se habla de fibrillas mineralizadas de colágeno (anchura de 100 a 300 nanómetros). El nivel 2 se sitúa también a escala del nanómetro;
- 30 - Nivel 3 (figura 1c): varias fibrillas mineralizadas de colágeno están ensambladas lado a lado en haces paralelos, formando una fibra mineralizada de colágeno (anchura de 1 a 3 micrones). La escala del micrómetro se alcanza en el nivel 3 de organización;
- 35 - Nivel 4 (figura 1d): es complejo, ya que las fibrillas o bien las fibras mineralizadas de colágeno pueden organizarse en tres dimensiones. En efecto, se distingue a este nivel la coexistencia de campos en los que las fibrillas/fibras están alineadas según una dirección preferencial sobre una gran distancia y/o forman unas estructuras en arcos características de su apilamiento según una geometría denominada colestérica. Se distinguen también unos campos en los que las fibrillas/fibras no se organizan (campos denominados isotropos). La escala varía del micro al milímetro;
- 40 - Nivel 5 (figura 1e): el hueso compacto presenta una disposición de estructuras cilíndricas paralelas de tamaño milimétrico, designadas como "osteonas". En sección, estas osteonas aparecen constituidas por láminas concéntricas de colágeno;
- 45 - Nivel 6 (figura 1f): la parte central de los huesos largos rica en células se denomina "hueso esponjoso". A nivel de este hueso, unas láminas óseas forman una red macroporosa de tramos delgados e irregulares. La asociación hueso compacto/hueso esponjoso constituye el nivel 6 de organización. Se está a más de un milímetro;
- 50 - Nivel 7 (figura 1g): el último nivel es, simplemente, el hueso entero.

55 Varias clases de materiales sintéticos (designados como "materiales de implantes") o naturales (designados como "injertos) están propuestos en la técnica anterior. Los materiales de implantes son generalmente bio-inertes, es decir son simplemente tolerados por el organismo, o biocompatibles, es decir que se integran perfectamente en el organismo hospedante. Un injerto es un tejido óseo extraído de la persona a la que se destina (autoinjerto) o de una tercera persona (aloinjerto), y es generalmente osteo-conductor, es decir que es capaz de guiar el recrecimiento óseo.

60 Un sustituto óseo osteo-inductor, es decir capaz de inducir una reconstrucción ósea, constituye sin embargo un sustituto ideal. La elaboración de un material de este tipo es compleja. Su colocación necesita la utilización de constituyentes que tienen una naturaleza química y una fase cristalina particular con el fin de optimizar su perfecta integración dentro de un organismo humano o animal, y evitar así el rechazo. Su organización tridimensional debe ser reconstituida para asegurar, por un lado, las propiedades mecánicas y, por otro lado una porosidad apropiada para la colonización de dicho sustituyente por el tejido hospedante. El acceso a la organización de la trama orgánica

del hueso (20% en masa), así como su asociación con la fase mineral (70% en masa) en el tejido son muy difíciles de reproducir *in vitro*.

Se han efectuado numerosos trabajos para la síntesis de sustitutos óseos, y en particular unos trabajos que se basan en la mineralización de colágeno. La mineralización de colágeno de tendones óseos de pavo ha sido estudiada por W. Traub, *et al.* [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 9822-9826], pero el material obtenido no presenta una organización análoga a la del hueso. Se han efectuado otros ensayos con colágeno purificado *in vitro*, pero las condiciones de fuerte dilución en las que se efectuaron los ensayos no han permitido obtener un material que presente la densidad ósea y la organización tridimensional del colágeno encontrados en los tejidos óseos vivos [véanse D. Lickorish, *et al.* (J. Biomed. Mat. Res. 2004, 68A, 19-27); S. Yunoki, *et al.*, (Mat. Lett., 2006, 60, 999-1002); D. A. Wahl, *et al.* (Eur. Cell. Mat. 2006, 11, 43-56)].

La cristalización de calcita CaCO_3 , a partir de una solución de CaCl_2 bajo una atmósfera de amoníaco generada por la descomposición térmica a temperatura ambiente de un polvo de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ha sido descrita por L. Addadi, *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 2732-2736).

Se conoce también precipitar el colágeno a partir de una solución ácida mediante un aumento del pH. R. L. Ehrman, *et al.*, (J. Nat. Cancer Inst. 1956, 16, 1375-1403) describen un procedimiento en el que una solución de colágeno en el ácido acético se pone en contacto con unos vapores de NH_3 . Se transforma en un gel que contiene unos granos finos. La estructura del material obtenido no está descrita.

M.M. Giraud-Guille, *et al.* (J. Mol. Biol. 1995, 251, 197-202) y (J. Mol. Biol. 1992, 224, 861-873) describen la estructura "cristal líquido" obtenida a partir de una solución concentrada en colágeno, así como la transición sol-gel obtenida por elevación del pH de ácido a básico.

G. Mosser, M. M. Giraud-Guille, *et al.*, (Matrix Biol. 2006, 25, 3-13) describen un procedimiento en el que una solución ácida en colágeno (5 mg/ml) se concentra progresivamente en unas microcámaras de vidrio con el fin de obtener una organización helicoidal de largo alcance de las moléculas de colágeno, así como un gradiente de concentración. La solución se pone entonces en contacto con vapores de amoníaco, para formar unas fibrillas de colágeno y estabilizar la organización colocada en fase líquida.

B. A. Harley, *et al.*, (Biomaterials 2006, 27, 866-874) describen la elaboración de una matriz estructurada de colágeno que contiene también un glucosaminoglicano. Unas microfibrillas de colágeno se mezclan con sulfato de condroitina de manera homogénea a 4°C. La solución se centrifuga después en un molde, se congela de manera ultrarrápida, se liofiliza y después se reticula a 105°C bajo un vacío de 50 mTorr durante 24 horas. La naturaleza fibrilar del colágeno no está descrita.

C. Guo, *et al.*, (Biomaterials 2007, 28, 1105-1114) describen la utilización de bolas magnéticas para alinear una solución de fibrillas de colágeno. Una solución de colágeno preparada en un tampón fosfato a concentraciones de 2,5 mg/ml, mantenida a 4°C, se pone en contacto con las bolas magnéticas. Las mismas muestras son también preparadas en presencia de células a una concentración final de colágeno a 1,2 mg/ml. En los dos casos, las muestras se ponen en un campo magnético de menos de 1G durante la inducción de la fibrillogénesis producida por una elevación de la temperatura a 37°C. Asimismo, se utiliza una atmósfera en CO_2 cuando unas células están integradas en la matriz. Las matrices son muy flojas y la naturaleza fibrilada del colágeno no se menciona. M. J. Olsza, *et al.*, (Calcif. Tissue Int. 2003, 72, 583-591) describen la calcificación de una esponja de colágeno, en presencia o en ausencia de un polímero de tipo poli(ácido aspártico). La esponja de colágeno está constituida por un colágeno de tipo I obtenido a partir de tendón bovino. El mineral es el carbonato de calcio y no el fosfato de calcio, por lo tanto no se obtiene ninguna fase apatita. La presencia de fibras estriadas no está demostrada y las fibras de colágeno no están orientadas. J. H. Bradt, *et al.*, (Chem. Mater. 1999, 11, 2694-2701) describen un procedimiento en el que se prepara a 4°C, por un lado una solución de colágeno (colágeno de tipo I de ternera) a 1 mg/ml acidificado por HCl y que contiene CaCl_2 y, por otro lado una solución tampón que contiene unos iones fosfato. La solución de fosfato se mezcla después con la solución de colágeno, permitiendo alcanzar un pH de 6,8, y el conjunto se calienta a 30°C. La coprecipitación da una mezcla de fases que contiene fosfato de calcio, hidroxiapatita y fosfato octacálcico. Además, las fibras de colágeno son aisladas no orientadas y no constituyen una matriz densa. N. Gehrke, N. Nassif, *et al.*, (Chem. Mater. 2005, 17, 6514-6516) describen la remineralización por carbonato de calcio, en presencia o en ausencia de un polímero de tipo poli(ácido aspártico), de la trama orgánica del nácar previamente desmineralizado.

W. Zhang, *et al.* (Chemistry of materials 2003, 15, 3221-3226) describe la preparación de nanofibrillas de colágeno mineralizado para formar unas estructuras que mimetizan el hueso natural. Una solución de colágeno a una concentración de 0,6 mg/ml se mezcla con una solución de NaH_2PO_4 para formar un material compuesto que presenta unos cristales de apatita coalineados con las fibrillas de colágeno.

Ninguno de los procedimientos de síntesis conocidos hoy en día permite obtener un sustituto óseo que reproduzca el nivel 4 de organización tridimensional del colágeno asociado a una fase mineral de cristales de apatita que se observan en el hueso natural.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un material sintético utilizable como sustituto óseo biocompatible, que tenga una estructura muy próxima a la estructura del hueso vivo (nivel 4), así como un procedimiento para su preparación.

El material sintético según la presente invención comprende una fase orgánica (I) y una fase mineral (II).

La fase orgánica (I) comprende unas fibrillas estriadas de colágeno constituidas por unas triples hélices de colágeno I y en las que la periodicidad de las estriaciones es de aproximadamente 67 nm, estando dichas fibrillas ordenadas a gran distancia según una geometría 3D que asocia unos campos alineados y unos campos colestéricos, así como unos campos isotrópicos en los que no están ordenadas.

La fase mineral (II) comprende unos cristales de apatita de estructura cristalina hexagonal, grupo de espacio 6/m, comprendiendo dichos cristales por lo menos unos iones calcio y por lo menos unos iones fosfato.

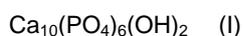
En el material de acuerdo con la invención, el eje c de los cristales de apatita de la fase mineral está coalineado con el eje longitudinal de las fibrillas estriadas de colágeno de la fase orgánica.

El contenido en colágeno dentro de dicho material es de por lo menos 75 mg/cm³.

Dentro de dicho material, el orden de tamaño de los diferentes campos (colestérico, alineación, isótopo) es de una cincuentena de micras aproximadamente.

Según una forma de realización particular, la fase mineral está constituida por cristales de hidroxiapatita pura. En el sentido de la presente invención, se entiende por "hidroxiapatita pura" una hidroxiapatita libre de otras fases de fosfato cristalizadas, tal como la brucita.

En un modo de realización particular de la invención, la fase mineral está constituida por cristales de hidroxiapatita estequiométrica de fórmula (I) siguiente:



Según una forma de realización particular de la invención, la relación atómica Ca/P de los cristales de hidroxiapatita de fórmula (I) es de 1,67.

Según otra forma de realización de la invención, la fase mineral comprende unos cristales de apatita que comprenden además por lo menos unos iones hidróxido y en los que los iones fosfato (tipo B) y/o los iones hidróxido (tipo A) son parcialmente sustituidos por unos iones carbonatos.

En estas hidroxiapatitas, uno o varios sitios de la estructura cristalina puede(n) estar libre(s) de ion(es). Se trata en este caso de hidroxiapatitas no estequiométricas que comprenden lo que se denomina entonces una o varias lagunas iónicas.

En otro modo de realización, la fase mineral comprende unos cristales de apatita que comprenden unos iones Ca²⁺, unos iones PO₄³⁻ y unos iones OH⁻, y en la que por lo menos uno de los iones Ca²⁺, PO₄³⁻ u OH⁻ está parcialmente sustituido por otros iones.

Entre los iones susceptibles de sustituir parcialmente los iones Ca²⁺, se pueden citar los iones Mg²⁺, Cu²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Na⁺, K⁺ y Eu³⁺.

Entre los iones susceptibles de sustituir parcialmente los iones PO₄³⁻, se pueden mencionar los iones CO₃²⁻, SiO₄³⁻, AsO₄³⁻, MnO₄³⁻, VO₄³⁻, CrO₄³⁻ y HPO₄²⁻.

Entre los iones susceptibles de sustituir parcialmente los iones OH⁻, se pueden mencionar los iones CO₃²⁻, F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, S²⁻ y O²⁻.

El material según la invención puede contener además una cantidad infinitesimal de proteoglicanos, de glicosaminoglicanos y/o de moléculas orgánicas que favorecen la mineralización. Por cantidad infinitesimal, se entiende una proporción inferior al 2%.

Las características de un material de la invención pueden ser determinadas por unos análisis en microscopio óptico, unos análisis en microscopio electrónico de barrido MEB, unos análisis en microscopio electrónico de transmisión MET, y unos análisis en difracción de los rayos X.

Unas láminas semifinas de un material según la invención, observadas en microscopio óptico en luz polarizada, muestran unas propiedades de birrefringencia. En un caso ideal, la observación de alternancias de bandas

iluminadas y de bandas no iluminadas asociada al desplazamiento de estas franjas durante la rotación de la platina del microscopio indica una estructura helicoidal.

5 Unas muestras del material de la invención, analizadas en MEB, muestran unas fibrillas orientadas sumergidas en una ganga mineralizada, sin cúmulos cristalinos individualizados de orden micrométrico.

10 Unas imágenes de difusión de los rayos X en ángulos pequeños, efectuadas sobre un material de la invención, muestran la señal anisótropa de las fibrillas de colágeno y los armónicos del periodo $D = 67 \text{ nm}$. Unas imágenes de difusión de los rayos X en ángulos grandes muestran los picos principales de la fase apatita. La existencia de una coalineación entre la señal de las fibrillas y la del mineral caracteriza el material de la invención. Esta coalineación se pone más particularmente en evidencia localmente en las zonas en las que las fibrillas están alineadas.

15 Un material según la invención se puede obtener mediante un procedimiento que consiste en preparar una solución acuosa ácida inicial de colágeno precursor de la fase orgánica (I), y por lo menos una solución acuosa de precursores de la fase mineral (II), y en hacer precipitar el colágeno por elevación del pH hasta un valor de por lo menos 7. Se caracteriza por que:

- 20 - la concentración en colágeno dentro de la solución acuosa ácida es de por lo menos 75 mg/ml y permanece constante durante dicha elevación del pH,
- los precursores de la fase mineral comprenden por lo menos una sal de calcio y por lo menos una sal de fosfato,
- 25 - la precipitación de la fase mineral (II) se efectúa mediante la puesta en contacto de la solución de precursores de la fase mineral con la fase orgánica (I), siendo dicha puesta en contacto efectuada antes o después de la precipitación de dicha fase orgánica (I). La duración del contacto se fija según la velocidad de precipitación y el nivel de carga mineral considerado en el material final.

30 En un primer modo de realización del procedimiento, se hace precipitar el colágeno de la fase orgánica (I) antes de su puesta en contacto con una solución neutra de precursores de la fase mineral (II). En este caso, la solución de precursores de la fase mineral (II) contiene por lo menos dichas sales de calcio y por lo menos dichas sales de fosfato. La proporción de fase mineral en el material final está modulada por la cantidad de iones aportada a la solución. En este modo de realización, el colágeno ha adquirido su estructura fibrilar antes de su puesta en contacto con la fase mineral.

35 En un segundo modo de realización del procedimiento, una solución ácida de precursores de la fase orgánica (I) se pone en contacto con una solución ácida de precursores de (II). La mezcla se somete entonces a un aumento del pH que induce la coprecipitación del colágeno y de la apatita. En este modo de realización, el mantenimiento constante de la concentración inicial en colágeno es particularmente importante. Un primer medio para evitar la dilución es contener la solución ácida concentrada de precursores de la fase orgánica (I) en un molde, cuya forma es adecuada para el uso deseado y encerrado en una membrana de diálisis. Un segundo medio es introducir la solución concentrada de colágeno en una envoltura flexible constituida por una membrana de diálisis. El molde o dicha envoltura son después sumergidos en la solución de precursores de la fase mineral (II).

45 Cuando la fase mineral II del material de acuerdo con la invención está constituida por cristales de hidroxipatita pura, el procedimiento se realiza preferentemente en un recinto cerrado en el que se dispone:

- 50 - por lo menos un primer recipiente que contiene una solución acuosa de por lo menos una sal de fosfato y de por lo menos una sal de calcio, precursores de la fase mineral II, en la que se sumerge por lo menos un tubo de diálisis que contiene una solución acuosa ácida inicial de colágeno precursor de la fase orgánica (I),
- por lo menos un segundo recipiente que contiene una solución de amoníaco o un polvo de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$;

entendiéndose que:

- 55 - la relación (volumen de la solución de precursores de la fase mineral I)/(volumen interno del recinto cerrado) es de $2 \cdot 10^{-3}$ aproximadamente,
- la altura de la solución de precursores de la fase mineral I contenida en el primer recipiente varía de 3 a 5 cm aproximadamente, siendo el diámetro de dicho recipiente de 2 a 5 cm aproximadamente;
- 60 - la relación (volumen de la solución acuosa de amoníaco)/(volumen interno del recinto cerrado) es de $8 \cdot 10^{-3}$ o la relación volumen del polvo de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /(volumen del recinto cerrado) es de $6 \cdot 10^{-3}$ aproximadamente.

65 El respeto de estas condiciones lleva a la obtención de un material en el que la fase mineral II está constituida por apatita pura, libre de cualquier otro tipo de fase de fosfato de calcio.

La solución acuosa ácida inicial de colágeno presenta preferentemente las características siguientes:

- 5
- su concentración en colágeno está entre 75 mg/ml y 1000 mg/ml, preferentemente entre 100 mg/ml y 400 mg/ml,
 - su pH es inferior a 4, preferentemente inferior a 3, en presencia de ácidos, preferentemente de ácido acético 0,5 M.

10 La solución de precursores de la fase mineral (II) presenta preferentemente las características siguientes:

- la concentración en precursor de calcio, por ejemplo CaCl_2 , es inferior al límite de la solubilidad, preferentemente de 2,5 mM a 1,5 M, más particularmente de 11 a 550 mM);
- 15 - la concentración en precursor de fosfato, por ejemplo NaH_2PO_4 , es inferior al límite de solubilidad, preferentemente de 1,5 a 900 mM, más particularmente de 66 a 330 mM;
- las cantidades de precursores son tales que la relación molar Ca/P está entre 1,5 y 1,8, preferentemente es del orden de 1,67.

20 A título de ejemplo, el límite de solubilidad a 20°C es de 7,08 M para NaH_2PO_4 y de 3,83 M para CaCl_2 .

25 Cuando la fase mineral del material deseado comprende unos cristales de apatita que comprenden unos iones Ca^{2+} , unos iones PO_4^{3-} y unos iones OH^- , y en la que por lo menos unos de los iones Ca^{2+} , PO_4^{3-} u OH^- está parcialmente sustituido por otros iones, la solución de precursores de la fase mineral contiene además una o varias sales, cuyo catión está destinado a sustituir por lo menos parcialmente Ca^{2+} y/o una o más sales cuyo anión está destinado a sustituir por lo menos parcialmente PO_4^{3-} y/o OH^- .

30 Las sales de los cationes destinados a sustituir Ca^{2+} se seleccionan ventajosamente de entre las sales que contienen unos cationes monovalentes o divalentes, tales como, por ejemplo, MgCl_2 , BaCl_2 , SrCl_2 , NaCl , KCl , y NH_4Cl . El precursor de CO_3^{2-} puede ser NaHCO_3 . La cantidad de precursor de CO_3^{2-} es preferentemente tal que la relación $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHCO}_3$ sea igual a 1. En presencia de carbonato, la relación molar Ca/(P+C) está entre 1,5 y 1,8, preferentemente del orden de 1,67.

35 La solución de precursores de la fase mineral (II) puede contener además unos proteoglicanos, unos glicosaminoglicanos y/o unas moléculas orgánicas que favorecen la mineralización, tales como unas cadenas de polímeros de aminoácidos ácidos, preferentemente un poli(ácido aspártico) que tiene una longitud de cadena entre 5 y 150 unidades de aminoácidos, preferentemente aproximadamente 15, y con una concentración entre 0,01 $\mu\text{g/ml}$ y 1,5 mg/ml, preferentemente 10 $\mu\text{g/ml}$.

40 La elevación del pH se efectúa ventajosamente por una atmósfera gaseosa básica, en particular una atmósfera de NH_3 o de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ en un modo de realización particular en el que PO_4^{3-} u OH^- están parcialmente sustituidos por CO_3^{2-} .

45 En un modo de realización particular, el procedimiento comprende una etapa adicional durante la cual se impregna el material obtenido por coprecipitación, mediante una solución denominada SBF ("Stimulated Body Fluid") análoga a un fluido biológico, y después se ajusta el pH del medio a 7,4.

50	NaCl	de 137 a 213 mM (por ejemplo 213,0 mM)
	NaHCO_3	de 1,2 a 6,3 mM (por ejemplo 6,3 mM)
	KCl	de 3 a 4,5 mM (por ejemplo 4,5 mM)
	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	de 1 a 1,5 mM (por ejemplo 1,5 mM)
	CaCl_2	de 2,6 a 3,8 mM (por ejemplo 3,8 mM)
	$\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot \text{Na}_2\text{SO}_4$	de 0,5 a 0,75 mM (por ejemplo 0,75 mM)
55	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	de 1,5 a 2,3 mM (por ejemplo 2,3 mM).

Las concentraciones de esta solución SBF representan aproximadamente 1,5 veces las efectivamente medidas para un fluido biológico (Véase Zhang L.-J., *et al.*, Mater. Lett. 2004, 58,719-722).

60 El pH se puede ajustar a 7,4 con una mezcla de tris(hidroxiometil)aminometano 0,01 mol/l y de HCl a 0,01 mol/l a 37°C.

La presente invención se describe más en detalle con la ayuda de los ejemplos siguientes, a los que sin embargo no está limitada.

65 En los ejemplos, se ha utilizado un colágeno de tipo I preparado a partir de colas de ratas jóvenes Wistar, según el

modo de realización siguiente. Los tendones de cola de rata se extirpan en una campana de flujo laminar esterilizada, después se lavan en una solución tampón fosfato salino que contiene 137 mM de NaCl, 2,68 mM de KCl, 8,07 mM de Na_2HPO_4 , y 1,47 mM de NaH_2PO_4 , para eliminar las células y los rastros de sangre. Los tendones son después empapados en una solución de NaCl 4 M para eliminar las células intactas restantes y precipitar una parte de las proteínas de alto peso molecular. Después de un nuevo lavado con la solución tampón salina, los tendones se disuelven en una solución acuosa de 500 mM de ácido acético. La solución así obtenida se clarifica por centrifugación a 41000 g durante 2 h. Las proteínas distintas del colágeno de tipo I son precipitadas de manera selectiva en una solución acuosa de NaCl 300 mM, y después eliminadas por centrifugación a 41000 g durante 3 h. El colágeno se recupera a partir del sobrenadante por precipitación en una solución acuosa de NaCl 600 nM seguida de una centrifugación a 3000 g durante 45 minutos. Los residuos así obtenidos se disuelven en una solución acuosa de ácido acético 500 mM, y después se dializan cuidadosamente en el mismo disolvente para eliminar totalmente el NaCl.

Las soluciones son mantenidas a 4°C y centrifugadas a 41000 g durante 4 horas antes de ser utilizadas. Las soluciones de colágeno a diferentes concentraciones se preparan por diálisis inversa contra polietilenglicol (35 kDa, Fluka), disuelto en una solución acuosa de ácido acético 500 mM, hasta el 50% (m/v) o por evaporación lenta en una campana de flujo laminar. La concentración en colágeno de la solución ácida se ha determinado antes de la fibrillogénesis por determinación de la cantidad de hidroxiprolina. Evidentemente, se pueden utilizar otras fuentes de colágeno.

Ejemplo 1

Se ha preparado una solución precursora de la fase mineral disolviendo en 40 ml de agua, 110 mM de NaH_2PO_4 , 66 mM de CaCl_2 , 500 mM de ácido acético y 0,40 μg de poli(ácido aspártico). La solución se equilibra a pH 2,2.

La solución de colágeno utilizada en este ejemplo se ha dosificado a aproximadamente 300 mg/ml. Se presenta en forma de un gel elástico parcialmente fibrilar.

La solución de colágeno se ha introducido en un tubo de diálisis (PM = 3500 Da), y el tubo se ha colocado en la solución de precursores de la fase inorgánica en un recipiente abierto. Después, dicho recipiente se ha colocado bajo atmósfera de amoníaco hasta la completa precipitación de las sales a una temperatura de 20°C.

La atmósfera de amoníaco ha provocado una coprecipitación de colágeno y de hidroxipatita, visible a partir de 3 horas. Se puede dejar el medio de reacción madurar durante 8 días.

Las muestras se han lavado por inmersión en una solución, ventajosamente una solución tampón con fosfato PBS (phosphate buffer solution).

La figura 2 ilustra el análisis del material por difusión de los rayos X. La figura 2a representa una imagen SAXS y la figura 2b representa una imagen WAXS. La imagen SAXS muestra la señal anisótropa de las fibrillas de colágeno y los armónicos del periodo $D = 67 \text{ nm}$; esto pone en evidencia la periodicidad de las estriaciones cada 67 nm a lo largo del eje principal de las fibrillas. La imagen WAXS muestra que la reflexión (002), característica de la presencia de apatita, está reforzada en la misma dirección que la señal de las fibrillas observada en (a). Esto indica por lo tanto que el eje c de los cristales de apatita está orientado a lo largo del eje principal de las fibrillas de colágeno. La señal que corresponde a la inter-distancia d_{lateral} de las moléculas de colágeno en la fibrilla es perpendicular a la reflexión (002) y paralela a la reflexión (300) de la apatita. Los planos inter-reticulares están por lo tanto orientados preferentemente según la dirección de las moléculas de colágeno. Esta firma de la difracción de los rayos X es comparable a la encontrada en el hueso.

La figura 3 representa una micrografía MEB. Muestra la presencia de fibrillas orientadas (campos alineados) mineralizadas.

La figura 4 representa una sección semi-fina coloreada con azul de toluidina que sirve de agente de contraste del material, observado por microscopio óptico con luz polarizada entre polarizadores cruzados (A, B). 4B representa la misma zona que 4A, también observada entre polarizadores cruzados pero girados en 45° con respecto a 4A. La birrefringencia se debe, por un lado, a la organización de la fase orgánica y, por otro lado, a su impregnación por la fase mineral. La variación de las bandas de birrefringencia entre las dos posiciones de los polarizadores indica la coexistencia de campos distintos: (i) un campo alineado caracterizado por una zona de birrefringencia que se extingue entre 4A y 4B, ya que las fibrillas de colágeno mineralizadas están alineadas unas con respecto a las otras; y (ii) un campo colestérico caracterizado por una zona de birrefringencia cuya alternancia de bandas claras y oscuras se invierten entre 4A y 4B, ya que la orientación de las fibrillas de colágeno mineralizadas giran regularmente de un plano al otro. Un tercer campo coexiste con los dos anteriores, se trata de un campo denominado "isótropo" en el que las fibrillas de colágeno mineralizadas se distribuyen de manera aleatoria dentro del material; este campo no presenta por lo tanto ninguna zona de birrefringencia en 4A y 4B.

También se han efectuado unas mediciones de las propiedades mecánicas del material así preparado, en particular

el módulo elástico, según la técnica de nanoindentación. Las mediciones se efectuaron con un sistema nanomecánico de indentación de tipo Ubi 1 (Hysitron Inc., Minneapolis, MN, USA) y una punta de indentación Berkovich, $\sim 10 \mu\text{m}^2$. Se ha encontrado que la relación de las moléculas elásticas a 0° y 90° con respecto al eje longitudinal de las fibrillas de colágeno es de $1,43 \pm 1,18$. El orden de tamaño de esta relación es comparable al obtenido para un hueso nativo, es decir $1,50 \pm 0,315$, lo cual indica que el grado de anisotropía del presente material, y así su organización fibrilar, es similar al encontrado en el hueso.

Ejemplo 2

Se ha inyectado una solución diluida de colágeno (1 mg/l) con el fin de contrarrestar una evaporación de agua en una microcámara de vidrio de 15 μl . La inyección continúa hasta obtener una fase densa cristalina líquida de colágeno. El colágeno se precipitó bajo una atmósfera de amoníaco, después la microcámara se sumerge en la solución de precursores minerales (conteniendo dicha solución: NaCl 213,0 mM, NaHCO_3 6,3 mM, KCl 4,5 mM, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM, CaCl_2 3,8 mM, $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{Na}_2\text{SO}_4$ 0,75 mM, y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,3 mM), se ajusta el pH a 7,4 y se mantiene en esta solución durante un tiempo de 6 meses a una temperatura de 37°C .

Después, el material precipitado se lava por inmersión en una solución tampón con fosfato (PBS).

La figura 5 ilustra el análisis del material por difusión de los rayos X. La figura 5a representa una imagen SAXS y 5b representa una imagen WAXS. Las dos imágenes son análogas a las del ejemplo 1.

Ejemplo 3

Se ha inyectado una solución diluida a 5 mg/ml de colágeno, previamente dializada contra una solución de NaH_2PO_4 (66 mM) y de CaCl_2 (110 mM), con el fin de contrarrestar una evaporación de agua en una microcámara de vidrio de 15 μl . La inyección continúa hasta obtener una fase densa cristalina líquida de colágeno. La microcámara se sumerge en una solución precursora de la fase inorgánica, análoga a la del ejemplo 1, en un recipiente abierto. Dicho recipiente se coloca después bajo atmósfera de carbonato de amonio hasta la precipitación completa de las sales a una temperatura de 20°C .

La atmósfera de amoníaco y de dióxido de carbono ha provocado una coprecipitación de colágeno y de hidroxiapatita, visible a partir de las 3 horas. Se puede dejar madurar el medio de reacción durante 8 días.

Las muestras se lavaron por inmersión en una solución tampón con fosfato PBS (PBS).

La figura 6 ilustra una micrografía MEB. Muestra la presencia de fibras mineralizadas que presentan una organización helicoidal (campo colestérico).

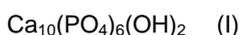
REIVINDICACIONES

1. Material sintético que comprende una fase orgánica (I) y una fase mineral (II), caracterizado por que:

- 5 - la fase orgánica (I) comprende unas fibrillas estriadas de colágeno constituidas por unas triples hélices de colágeno I y en las que la periodicidad de las estriaciones es de 67 nm, estando dichas fibrillas ordenadas a gran distancia según una geometría 3D que asocia unos campos alineados y unos campos colestéricos, así como unos campos isotrópicos en los que no están ordenadas;
- 10 - la fase mineral (II) comprende unos cristales de apatita de estructura cristalina hexagonal, grupo de espacio 6/m, comprendiendo dichos cristales por lo menos unos iones calcio y por lo menos unos iones fosfato;
- 15 - el eje c de dichos cristales de apatita de la fase mineral está coalineado con el eje longitudinal de las fibrillas estriadas de colágeno de la fase orgánica;
- el contenido en colágeno en el seno de dicho material es de por lo menos 75 mg/cm³.

2. Material según la reivindicación 1, caracterizado por que la fase mineral está constituida por cristales de hidroxiapatita pura.

3. Material según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la fase mineral está constituida por cristales de hidroxiapatita estequiométrica de fórmula (I) siguiente:



4. Material según la reivindicación 3, caracterizado por que la relación atómica Ca/P de los cristales de hidroxiapatita de fórmula (I) es de 1,67.

5. Material según la reivindicación 1, caracterizado por que la fase mineral comprende unos cristales de apatita que comprenden además por lo menos unos iones hidróxido y en los que los iones fosfato y/o los iones hidróxido son parcialmente sustituidos por unos iones carbonatos.

6. Material según la reivindicación 1, caracterizado por que la fase mineral comprende unos cristales de apatita que comprenden unos iones Ca²⁺, unos iones PO₄³⁻ y unos iones OH⁻, y en la que uno por lo menos de los iones Ca²⁺, PO₄³⁻ u OH⁻ está parcialmente sustituido por otros iones, entendiéndose que:

- los iones susceptibles de sustituir parcialmente los iones Ca²⁺, se seleccionan de entre los iones Mg²⁺, Cu²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Na⁺, K⁺ y Eu³⁺;
- los iones susceptibles de sustituir parcialmente los iones PO₄³⁻, se seleccionan de entre los iones CO₃²⁻, SiO₄³⁻, AsO₄³⁻, MnO₄³⁻, VO₄³⁻, CrO₄³⁻ y HPO₄²⁻; y
- los iones susceptibles de sustituir parcialmente los iones OH⁻, se seleccionan de entre los iones CO₃²⁻, F⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, S²⁻ y O²⁻.

7. Material según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que contiene además una cantidad de proteoglicanos, de glicosaminoglicanos y/o de moléculas orgánicas que favorecen la mineralización, inferior al 2%.

8. Procedimiento de preparación de un material según la reivindicación 1, que consiste en preparar una solución acuosa ácida inicial de colágeno precursor de la fase orgánica (I), y por lo menos una solución acuosa de precursores de la fase mineral (II) y en hacer precipitar el colágeno por elevación del pH hasta un valor de por lo menos 7, caracterizado por que:

- la concentración en colágeno en el seno de la solución acuosa ácida es de por lo menos 75 mg/ml y permanece constante durante dicha elevación del pH,
- los precursores de la fase mineral comprenden por lo menos una sal de calcio y por lo menos una sal de fosfato,
- la precipitación de la fase mineral (II) se efectúa mediante la puesta en contacto de la solución de precursores de la fase mineral con la fase orgánica (I), siendo dicha puesta en contacto efectuada antes o después de la precipitación de dicha fase orgánica (I).

9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que se hace precipitar el colágeno de la fase orgánica (I) antes de su puesta en contacto con una solución neutra de precursores de la fase mineral (II), conteniendo dicha

solución neutra por lo menos dichas sales de calcio y por lo menos dichas sales de fosfato.

5 10. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que una solución ácida de precursores de la fase orgánica (I) se pone en contacto con una solución ácida de precursores de la fase mineral (II), y la mezcla así obtenida se somete a un aumento del pH que induce la coprecipitación del colágeno y de la apatita.

10 11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que la solución ácida concentrada de precursores de la fase orgánica (I) está contenida en un molde que está encerrado en una membrana de diálisis, siendo el conjunto sumergido a continuación en la solución de precursores de la fase mineral (II).

12. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que la solución concentrada de colágeno se introduce en un envoltorio flexible constituido por una membrana de diálisis, siendo dicho envoltorio sumergido a continuación en la solución de precursores de la fase mineral (II).

15 13. Procedimiento según la reivindicación 8, para la preparación de un material en el que la fase mineral II está constituida por cristales de hidroxiapatita pura y tal como se define en la reivindicación 2, caracterizado por que se realiza en un recinto cerrado en el que se dispone:

- 20
- por lo menos un primer recipiente que contiene una solución acuosa de por lo menos una sal de fosfato y de por lo menos una sal de calcio, precursores de la fase mineral II, en la que se sumerge por lo menos un tubo de diálisis que contiene una solución acuosa ácida inicial de colágeno precursor de la fase orgánica (I),
 - por lo menos un segundo recipiente que contiene una solución de amoníaco o un polvo de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$;

25 entendiéndose que:

- la relación (volumen de la solución de precursores de la fase mineral I)/(volumen interno del recinto cerrado) es de $2 \cdot 10^{-3}$,
 - la altura de la solución de precursores de la fase mineral I contenida en el primer recipiente varía de 3 a 5 cm, siendo el diámetro de dicho recipiente de 2 a 5 cm aproximadamente;
 - la relación (volumen de la solución acuosa de amoníaco)/(volumen interno del recinto cerrado) es de $8 \cdot 10^{-3}$ o la relación volumen del polvo de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /(volumen del recinto cerrado) es de $6 \cdot 10^{-3}$.
- 30
- 35

14. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la solución acuosa ácida inicial de colágeno presenta las características siguientes:

- 40
- su concentración en colágeno es de 75 mg/ml a 1000 mg/ml;
 - su pH es inferior a 4, en presencia de ácidos.

15. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la solución de precursores de la fase mineral (II) presenta las características siguientes:

- 45
- la concentración en precursor de calcio es inferior al límite de solubilidad;
 - la concentración en precursor de fosfato es inferior al límite de solubilidad;
 - las cantidades de precursores son tales que la relación molar Ca/P está entre 1,5 y 1,8.

50 16. Procedimiento según la reivindicación 8, para la preparación de un material según la reivindicación 6, caracterizado por que la solución de precursores de la fase mineral contiene además una o varias sales cuyo catión está destinado a sustituir por lo menos parcialmente Ca^{2+} , y/o una o varias sales cuyo anión está destinado a sustituir por lo menos parcialmente PO_4^{3-} u OH^- .

55 17. Procedimiento según la reivindicación 8, para la preparación de un material según la reivindicación 7, caracterizado por que la solución de precursores de la fase mineral (II) contiene además unos proteoglicanos, unos glicosaminoglicanos y/o unas moléculas orgánicas que favorecen la mineralización.

18. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la elevación del pH se efectúa por una atmósfera gaseosa básica.

Fig. 1

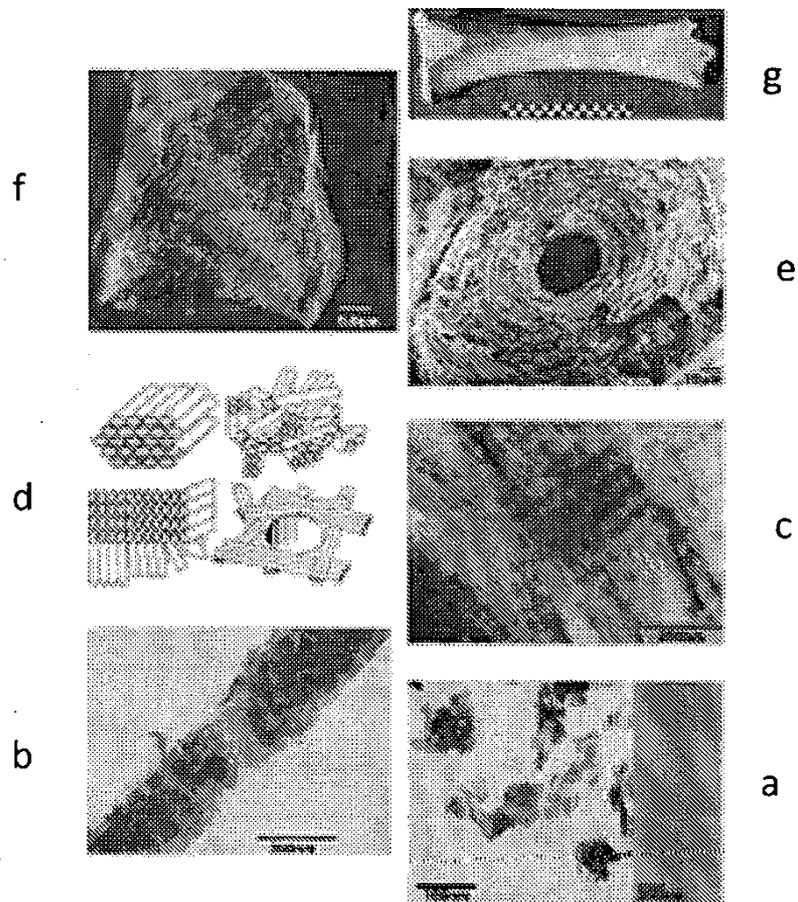


Fig. 2

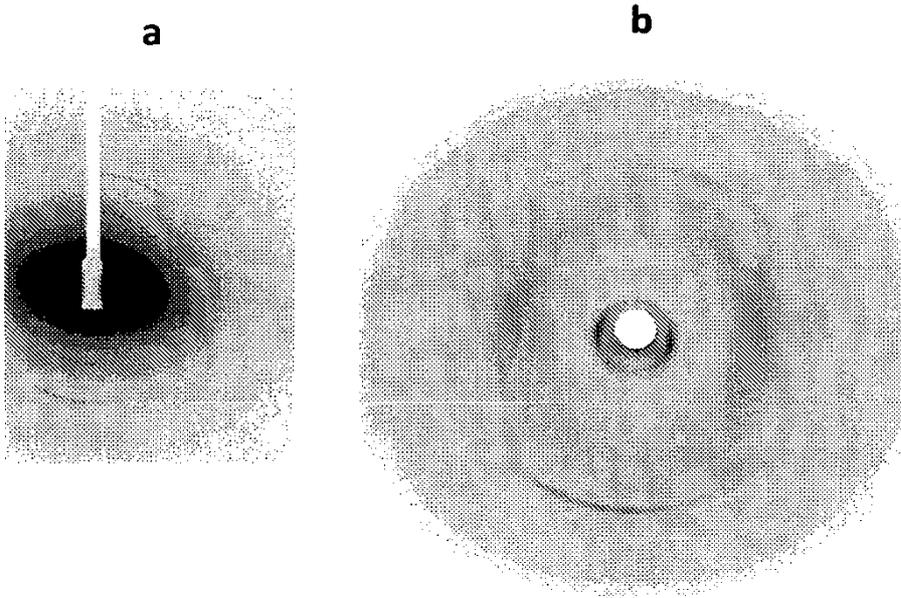


Fig. 3

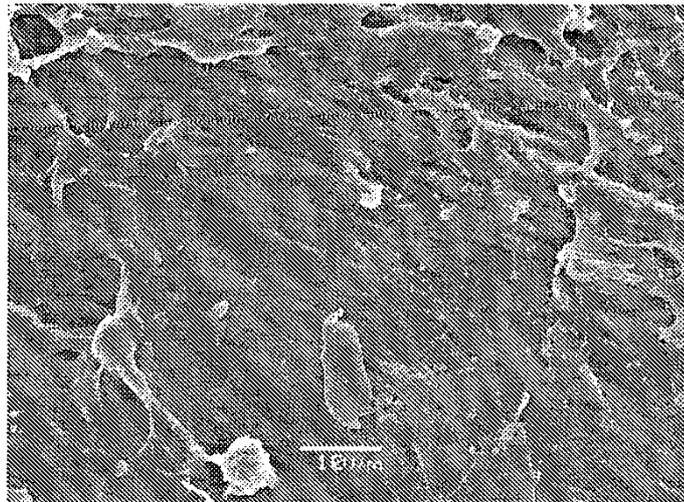


Fig. 4

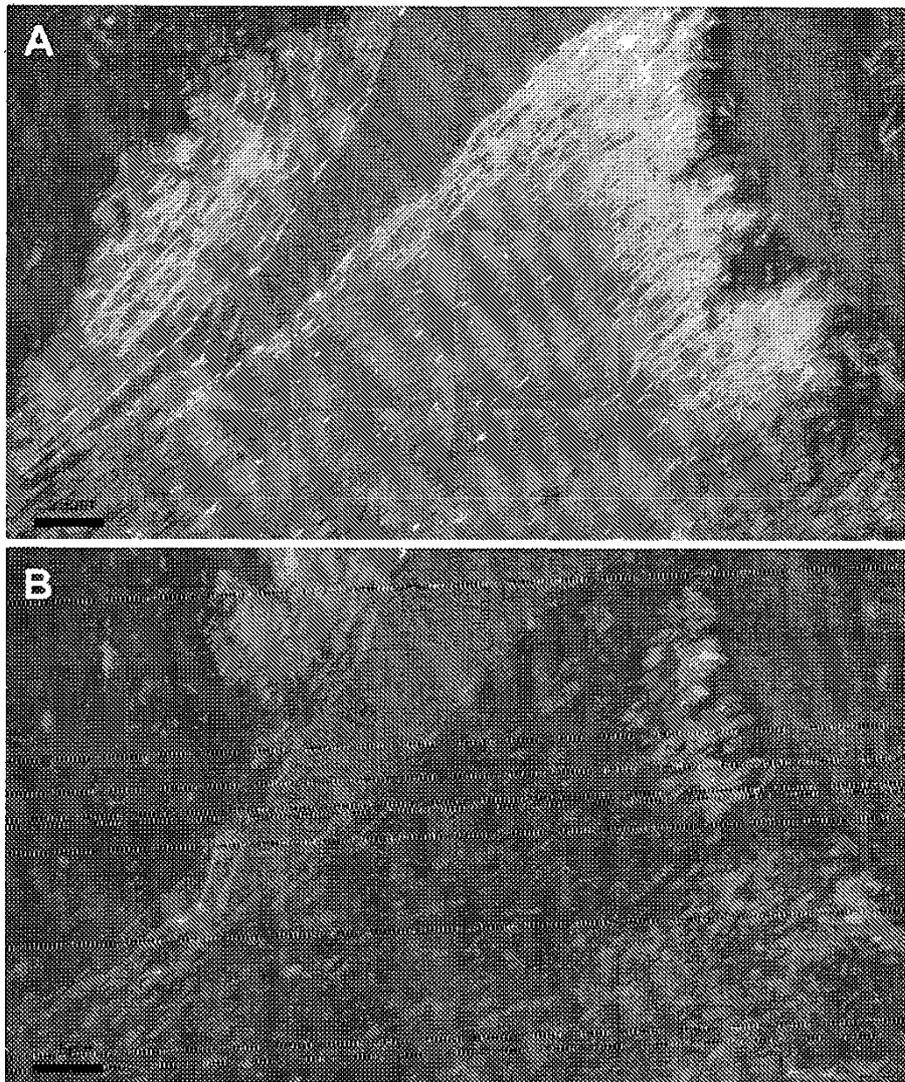


Fig. 5

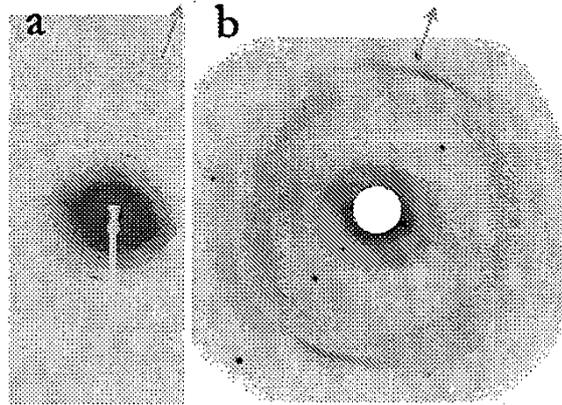


Fig. 6

