

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 456**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/42** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011** **E 11817517 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 2654816**

54 Título: **Material sustituto de hueso**

30 Prioridad:

**22.12.2010 EP 10015924**

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

**27.03.2015**

73 Titular/es:

**GEISTLICH PHARMA AG (100.0%)  
Bahnhofstrasse 40  
6110 Wolhusen, CH**

72 Inventor/es:

**BUFLER, MICHAEL ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 532 456 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

Material sustituto de hueso

La invención se refiere a un nuevo material bifásico sustituto de hueso con una estructura de bicapa basada en fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) que está impregnada con fibras de colágeno, a un procedimiento para preparar ese material bifásico sustituto de hueso y a su uso como un implante o una prótesis para apoyar la formación ósea, la regeneración ósea, la reparación ósea, la remodelación ósea y/o la reposición ósea en una zona defectuosa de un ser humano o animal.

Los defectos en la estructura ósea surgen en una variedad de circunstancias, tales como un traumatismo, una enfermedad y cirugía y todavía hay una necesidad de una reparación eficaz de defectos óseos en diversos campos quirúrgicos.

Se han usado numerosos materiales y composiciones naturales y sintéticos para estimular la curación en la zona de un defecto óseo. Un material natural sustituto de hueso osteoconductor muy conocido que promueve el crecimiento óseo en defectos óseos periodontales y maxilofaciales es Geistlich Bio-Oss®, disponible comercialmente de Geistlich Pharma AG. Ese material se fabrica a partir de hueso natural mediante un procedimiento descrito en la Patente de EE. UU. N° 5.167.961, que permite la conservación de la arquitectura trabecular y la estructura nanocristalina del hueso natural, dando como resultado una excelente matriz osteoconductor que no se reabsorbe muy rápidamente.

Los sistemas de fosfato tricálcico / hidroxiapatito (TCP/HAP) y su uso como materiales sustitutos de hueso se describen, por ejemplo, en US-6.338.752 que divulga un procedimiento para preparar un cemento bifásico de  $\alpha$ -TCP/HAP calentando una mezcla en polvo de fosfato amónico y HAP a 1.200-1.500°C.

La Patente Europea EP-285826 describe un procedimiento para la producción de una capa de HAP sobre cuerpos metálicos y no metálicos para implantes mediante la aplicación de una capa de  $\alpha$ -TCP y convertir completamente la capa de  $\alpha$ -TCP en HAP mediante la reacción con agua de pH 2 a 7 a 80-100°C. El producto obtenido es un cuerpo metálico o no metálico cubierto con una capa de HAP.

El documento WO 97/41273 describe un procedimiento para revestir un sustrato tal como, notablemente, hidroxiapatito (HAP) u otros fosfatos cálcicos (CAP) con un revestimiento de hidroxiapatito carbonatado, es decir hidroxiapatito en el que los iones fosfato y/o hidroxilo se reemplazan parcialmente por iones bicarbonato, mediante un procedimiento que comprende (a) sumergir el sustrato en una solución de pH 6,8 a 8,0 que contiene iones calcio, iones fosfato e iones bicarbonato a una temperatura inferior a 50°C, (b) calentar la porción de la solución en contacto con el sustrato hasta una temperatura de 50 a 80°C hasta que tenga un pH mayor de 8, (c) mantener el sustrato en contacto con la solución alcalina obtenida en la etapa (b) para formar un revestimiento de hidroxiapatito carbonatado, y (d) extraer el sustrato de la solución y someter el revestimiento a secado. Se divulga que los iones actúan como inhibidores del desarrollo de cristales de hidroxiapatito, dando como resultado cristales no estequiométricos que contienen defectos y que tienen dimensiones bastante pequeñas, a saber 10-40 nm de longitud y 3-10 nm de anchura (véase la página 7, líneas 1-7).

Los componentes de sistemas de fosfato cálcico / hidroxiapatito (CAP/HAP), especialmente sistemas de TCP/HAP, difieren en su estabilidad termodinámica. Debido a esta diferencia, cuando los sistemas de CAP/HAP se implantan en un mamífero, en particular un paciente humano, la solubilidad del TCP y otros fosfatos cálcicos es superior en el fluido corporal que la solubilidad de HAP. La diferencia en la solubilidad entre los fosfatos cálcicos y el HAP provoca una ruptura de la estructura sinterizada desordenada del sistema de CAP/HAP debido a que el compuesto más soluble CAP (p. ej. TCP) se retira más rápidamente que el HAP. La interconexión sinterizada entre CAP y HAP producida a altas temperaturas también contribuye notablemente a la solubilidad superior del dispositivo en el entorno fisiológico. Dos tipos diferentes de reacciones dominan la degradación in vivo acelerada de tales materiales cerámicos: Disolución química y reabsorción biológica por las células. Ambos procesos provocan la disolución del material cerámico que por otra parte provoca una sobresaturación local de iones calcio, con lo que hay más iones calcio liberados que iones calcio adsorbidos. Ya no existe el equilibrio natural de iones cálcico, ni en la matriz extracelular ni en el tejido que rodea el implante. La perturbación local del equilibrio de calcio natural con respecto a la sobresaturación de iones calcio conduce a un incremento de la actividad de los osteoclastos y por lo tanto a una reabsorción descontrolada acelerada del material cerámico y un riesgo de reacciones inflamatorias adversas, especialmente cuando se usa una gran cantidad de material sintético sustituto de hueso.

Cuando se implanta en un paciente humano material sustituto de hueso Geistlich Bio-Oss®, el equilibrio de calcio natural prácticamente no se ve afectado, permaneciendo casi constante la concentración de iones calcio sobre la superficie del material y dentro de su entorno local. De ahí que la reabsorción biológica del material no tenga lugar o avance a una velocidad muy lenta sin el riesgo de reacciones inflamatorias adversas.

El objetivo de la invención divulgada en la solicitud de patente internacional n° PCT/EP2010/003590 publicada como WO 2010149296 era proporcionar un material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) que, como el material sustituto de hueso Geistlich Bio-Oss®, después de fijarse permitiera que la concentración de iones calcio sobre la superficie del material y dentro de su entorno local permaneciera casi constante y así no condujera a

un incremento en la actividad de los osteoclastos.

En efecto, el equilibrio de calcio natural que es necesario para la regeneración óptima de hueso no se debe perturbar o destruir. Además, el equilibrio de la concentración de calcio natural debe estar apoyado de forma duradera por el material sustituto de hueso hasta que se complete el proceso de regeneración. Cuando se cumplen esas condiciones no hay incremento de la actividad de los osteoclastos, de ahí que no haya riesgo de reacciones inflamatorias adversas.

La solicitud de patente internacional anterior presenta que el objetivo anterior se conseguía mediante un nuevo material sustituto de hueso de CAP/HAP nanocristalino bifásico con una estructura de bicapa biomimética exactamente definida obtenido bajo condiciones específicas que se describen allí.

En efecto, según se muestra mediante la observación bajo microscopía óptica de fluorescencia de ese nuevo material sustituto de hueso de CAP/HAP nanocristalino bifásico implantado en un mamífero, no hay un incremento detectable de la actividad de los osteoclastos en la proximidad del implante, lo que indica la ausencia de un aumento en la concentración de iones calcio sobre la superficie del material y dentro de su entorno local.

El nuevo material sustituto de hueso de CAP/HAP nanocristalino bifásico muestra propiedades in vivo muy interesantes.

La invención de la solicitud de patente internacional nº PCT/EP2010/003590 publicada como WO 2010149296 se refiere a un material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico que comprende un núcleo de CAP sinterizado y al menos una capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de HAP nanocristalino depositada sobre el núcleo de CAP sinterizado, en donde los nanocristales desarrollados epitaxialmente tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral del hueso humano, es decir una longitud de 30 a 46 nm y una anchura de 14 a 22 nm.

El núcleo de CAP sinterizado puede comprender fosfato tricálcico (TCP), notablemente un  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) o  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) y/o fosfato tetracálcico (TTCP) Ca<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O.

Según una realización frecuentemente usada, el núcleo de CAP sinterizado consiste esencialmente en TCP, prefiriéndose el  $\alpha$ -TCP.

La capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino es estructuralmente y químicamente casi idéntica al mineral de hueso humano natural.

La capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino generalmente tiene un grosor de al menos 15 a 50 nm, preferiblemente al menos 20 a 40 nm, más preferiblemente al menos 25 a 35 nm. Ese grosor mínimo corresponde a una capa de nanocristales de HAP en orientación epitaxial.

La capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino puede comprender una sola o múltiples capas de nanocristales de HAP en orientación epitaxial. El grosor de la capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino, que está relacionado con el número de tales capas de nanocristales de HAP en orientación epitaxial, se seleccionará según la aplicación pretendida del material sustituto de hueso como implante o prótesis en partes del cuerpo con diferentes cargas. El material sustituto de hueso de la invención está diseñado en efecto para funcionar in vivo como un sistemaseudovivo que transforma progresivamente el núcleo de CAP sinterizado en hidroxiapatito similar en tamaño y morfología al mineral óseo humano, dependiendo la velocidad de esa transformación de la velocidad de liberación de calcio por el núcleo de CAP sinterizado, que está en gran parte controlada por el grosor de la capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino.

Las propiedades del material sustituto de hueso de CAP/HAP están en gran parte controladas por el grosor de la capa desarrollada epitaxialmente de HAP cristalino. El término "propiedades" incluye la capacidad del sustituto de hueso de CAP/HAP para liberar una concentración constante de iones calcio al entorno local in vitro e in vivo.

El grosor de la capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino está en conexión con la relación del material nuclear de CAP sinterizado a HAP, estando generalmente dicha relación entre 5:95 y 95:5, preferiblemente de 10:90 a 90:10.

El material sustituto de hueso de CAP/HAP puede ser un material en partículas o un granulado, teniendo las partículas o gránulos un tamaño y una conformación deseados. Generalmente, las partículas o los gránulos son aproximadamente esféricos y tienen un diámetro de 1 a 5.000  $\mu$ m, preferiblemente de 10 a 5.000  $\mu$ m, en particular de 250 a 5.000  $\mu$ m.

El material sustituto de hueso de CAP/HAP también puede ser un cuerpo conformado, p. ej. un tornillo, un clavo, un perno o una estructura que tiene el perfil de una parte ósea del cuerpo tal como, notablemente, una cadera, una clavícula, una costilla, una mandíbula o una parte del cráneo. Tal tornillo, clavo o perno se puede usar en cirugía ortopédica reconstructiva para fijar un ligamento a un hueso, por ejemplo en la rodilla o el codo. Tal estructura que tiene el perfil de una parte ósea del cuerpo se puede usar en cirugía ortopédica como prótesis para reemplazar un

hueso o parte de hueso perdido o defectuoso.

El documento WO 2010149296 se refiere además a un procedimiento para preparar el material sustituto de hueso de CAP/HAP definido anteriormente que comprende las etapas de

- a) preparar un material nuclear de CAP sinterizado,
- 5 b) sumergir el material nuclear de CAP sinterizado en una solución acuosa a una temperatura entre 10°C y 50°C para comenzar el proceso de transformación de CAP en HAP, con lo que se forma una capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de hidroxiapatito nanocristalino sobre la superficie del material nuclear de CAP sinterizado, teniendo los nanocristales desarrollados epitaxialmente el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano,
- 10 c) detener la transformación separando el material sólido de la solución acuosa en un momento en el que está presente un revestimiento uniforme y cerrado de al menos una capa nanocristalina de HAP pero antes de que el proceso de transformación se acabe completamente,
- d) opcionalmente, esterilizar el material separado procedente de la etapa c).

15 El material nuclear de CAP sinterizado puede comprender fosfato tricálcico (TCP), notablemente un  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) o  $\beta$ -TCP ( $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y/o fosfato tetracálcico (TTCP)  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ .

Según una realización usada frecuentemente, el material nuclear de CAP sinterizado consiste esencialmente en TCP, prefiriéndose el  $\alpha$ -TCP.

20 La preparación del material nuclear de CAP sinterizado se puede realizar mediante métodos conocidos en la especialidad que comprenden en primer lugar mezclar polvos de hidrogenofosfato cálcico ( $\text{CaHPO}_4$ ), carbonato cálcico y/o hidróxido cálcico, a continuación calcinando y sinterizando la mezcla dentro de un intervalo de temperatura apropiado, dando de ese modo un material nuclear de CAP sinterizado en masa (véase, p. ej., Mathew M. et al., 1977, Acta. Cryst. B33: 1325; Dickens B. et al., 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232; y Durucan C. et al., 2002, J. Mat. Sci., 37:963).

25 Se puede así obtener un material nuclear de CAP sinterizado en masa mezclando polvos de hidrogenofosfato cálcico ( $\text{CaHPO}_4$ ), carbonato cálcico y/o hidróxido cálcico en relación estequiométrica, calcinando y sinterizando la mezcla en el intervalo de 1.200-1450°C, preferiblemente aproximadamente 1.400°C.

También se puede obtener un material nuclear de TTCP sinterizado en masa mediante el procedimiento descrito anteriormente.

30 El material de CAP sinterizado en masa preparado mediante tales métodos puede ser poroso con una porosidad de 2 a 80% en volumen y una amplia distribución de poros. Los parámetros de porosidad se seleccionarán según la aplicación pretendida del material sustituto de hueso de CAP/HAP.

El material nuclear de CAP sinterizado usado en la etapa b) puede ser

- el material nuclear de CAP sinterizado en masa preparado como se describe anteriormente,
- un material en partículas o granulado del material nuclear de CAP sinterizado obtenido a partir del material nuclear de CAP sinterizado en masa preparado como se describe anteriormente, usando métodos convencionales tales como machaqueo, trituración y/o molienda, y tamizado, o
- 35 - una preforma de material nuclear de CAP sinterizado que tiene la conformación y el tamaño deseados, p. ej. un tornillo, un clavo, un perno o una estructura que tiene el perfil de una parte ósea del cuerpo.

40 Tal preforma de cualquier conformación y tamaño deseados se puede obtener a partir del material nuclear sinterizado en masa preparado como se describe anteriormente, usando técnicas de prototipado muy conocidas tales como molienda CNC o impresión 3D (véase, por ejemplo, Bartolo P. et al., 2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-47682-7; Landers R. et al., 2002, Biomaterials 23(23),4437; Yeong W.-Y. et al., 2004, Trends in Biotechnology, 22 (12), 643; y Seitz H. et al., 2005, Biomed. Mater. Res. 74B (2), 782).

45 La solución acuosa de la etapa b) puede ser agua pura, un fluido corporal simulado o un tampón. Es importante que el valor del pH de la solución de inmersión de la etapa b) sea casi neutro y permanezca estable a lo largo del procedimiento de transformación, preferiblemente dentro de un intervalo de pH de 5,5 a 9,0.

El tampón puede ser cualquier tampón en el intervalo de pH anterior pero preferiblemente es un tampón de fosfato con o sin calcio, magnesio y/o sodio.

50 El término "fluido corporal simulado" se refiere a cualquier solución que imite un fluido corporal. Preferiblemente, el

fluido corporal simulado tiene una concentración iónica similar a la del plasma sanguíneo.

El intervalo de temperatura en la etapa b) está generalmente entre 10°C y 50°C, preferiblemente entre 25 y 45°C, más preferiblemente entre 35°C y 40°C.

5 La etapa de inmersión b) induce en una primera fase una transición de fase de primer orden del material nuclear de CAP y por lo tanto la nucleación de precursores de nanocristales de HAP.

10 Durante la segunda fase, los precursores de HAP resultantes procedentes de la primera fase se desarrollarán y establecerán una capa compuesta nanocristalina epitaxial cerrada (es decir, que reviste completamente). La primera capa de nanocristales de HAP debe ser uniforme y cerrada y estar epitaxialmente conectada al material nuclear de CAP sinterizado a lo largo de su superficie externa, incluyendo, en caso de que el material nuclear de CAP sinterizado sea poroso, en sus poros.

15 Durante una tercera fase la transición de fase de primer orden puede avanzar dentro del material compuesto de bicapa recientemente formado para transformar adicionalmente el material nuclear de CAP (TCP o TTCP) sinterizado en HAP nanocristalino. Durante esta tercera etapa de transición de fase, se liberarán iones calcio durante un tiempo controlable mediante un proceso controlado por difusión lento hasta que una parte del material nuclear de CAP sinterizado se haya transformado en HAP nanocristalino. El tiempo de transformación y por lo tanto la velocidad de liberación de calcio se pueden controlar mediante la variación del grosor de la capa de HAP.

La capa de HAP nanocristalino desarrollada epitaxialmente de grosor apropiado se preparará in vitro, deteniéndose la transformación de CAP en HAP antes de que se complete.

20 Tan pronto como se establezca in vivo el material sustituto de hueso de CAP/HAP, se reactivará el proceso de transformación de CAP en HAP mediante contacto con los fluidos corporales y el material sustituto de hueso funcionará como un sistemaseudovivo que forma nuevo hidroxiapatito similar en tamaño y morfología a mineral óseo humano. Durante el proceso de transformación de fase in vivo los iones calcio transportados se liberarán en el entorno local apoyando el equilibrio de calcio local que es importante y beneficioso para procesos de regeneración ósea.

25 Debido a los diferentes tiempos de regeneración de los defectos óseos en regiones del cuerpo con cargas diferentes es importante que se pueda controlar la velocidad de liberación de calcio. Esto se puede conseguir mediante la variación del grosor de la capa de hidroxiapatito desarrollada epitaxialmente.

30 Por lo tanto, la etapa c) es una etapa muy crítica. El tiempo de exposición en la solución acuosa de la etapa b) se basa en el grosor de la capa de HAP deseado. Es necesaria al menos una capa de HAP nanocristalino en orientación epitaxial. Es esencial que no se acabe la transformación de CAP en HAP.

El tiempo de exposición apropiado según el grosor deseado se puede calcular usando varias ecuaciones diferenciales termodinámicas muy conocidas para el experto en la especialidad de los fosfatos cálcicos y la química del cemento y el hormigón.

35 Véanse, por ejemplo: Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) Cem. Conc. Res.; 9:765; Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) Cem. Conc. Res.; 12:765; y Schlüssler, K.H. Mcedlov-Petrosjan, O.P.; (1990): Der Baustoffbeton, VEB Verlag Bauwesen, Berlín.

Transferir la solución de las ecuaciones diferenciales mencionadas anteriormente al sistema de CAP/HAP permite la predicción de la transición de fase de CAP en HAP y el grosor de la capa de modo que la capa epitaxial de HAP se pueda preparar de un modo estable y reproducible.

40 La separación del material sólido de la solución acuosa se realiza habitualmente mediante filtración y secado, usando técnicas muy conocidas en la especialidad.

La etapa de esterilización opcional d) se puede realizar mediante técnicas muy conocidas en la especialidad tales como irradiación y.

Ventajas de material sustituto de hueso de CAP/HAP de la invención anterior

45 Los nanocristales de HAP desarrollados epitaxialmente que rodean el material nuclear de CAP sinterizado son idénticos en tamaño y morfología a los cristales de apatito de mineral óseo humano natural según se muestra en la Tabla 1 posteriormente. Así, el material sustituto de hueso de CAP/HAP de la invención imita satisfactoriamente al material compuesto o la microestructura del hueso y está representando un material biomimético de mineral óseo humano.

50

Tabla 1

Comparación del tamaño y la morfología de los cristales de HAP para el sustituto de hueso de CAP/HAP de la invención y mineral óseo humano

Ejes cristalográficos (grupo espacial hexagonal P63/m)	CAP/HAP de la invención preparado a temperatura fisiológica. Tamaño de los cristales* [nm]	Mineral óseo humano natural Tamaño de los cristales* [nm]
a (1,0,0)	18 (±4)	15-21
b (0,1,0)	18 (±4)	15-21
c (0,0,1)	38 (±8)	34-45

- 5 \* El análisis del tamaño de los cristales se ha realizado usando TEM (microscopía electrónica de transmisión, por sus siglas en inglés), SPM (técnicas de microscopía con sonda de barrido, por sus siglas en inglés), así como el refinado de datos de difracción de rayos X usando el método de Bragg.

10 La concentración constante de iones calcio da como resultado una mejora de la adhesión de osteoblastos y osteoclastos a la superficie del HAP en la relación correcta para la osteogénesis y así a un estado estacionario en el ciclo de regeneración ósea. Se proporciona una superficie a la que los osteoblastos y osteoclastos se unen fácilmente en la relación correcta para la regeneración ósea.

Por otra parte, debido a sus propiedades superficiales altamente controlables, el material sustituto de hueso de CAP/HAP anterior puede funcionar como una matriz para moléculas bioactivas tales como proteínas de la matriz extracelular tales como, notablemente, factores de crecimiento para la regeneración ósea.

15 Se ha encontrado ahora que la adhesión de osteoblastos y osteoclastos a la superficie del HAP en la relación correcta para la osteogénesis se puede mejorar adicionalmente impregnando el material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso definido anteriormente con fibras de colágeno de modo que se imiten más los procesos naturales in vivo de formación ósea, regeneración ósea, reparación ósea, remodelación ósea y reposición ósea creando un entorno más cercano al del hueso o el hueso dañado, a saber una parte de hidroxiapatito y una matriz orgánica que comprende fibras de colágeno.

20 Las fibras de colágeno son generalmente fibras de colágeno tipo I, colágeno tipo III o una de sus mezclas, o fibras de colágeno tipo II.

Se han obtenido hasta ahora resultados interesantes, en particular con fibras derivadas de piel de cerdo que son una mezcla de colágeno I y colágeno III, siendo predominante el colágeno I.

25 La presente invención trata así de un material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso que comprende un núcleo de CAP sinterizado y al menos una capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de HAP nanocristalino depositada sobre el núcleo de CAP sinterizado, en el que los nanocristales desarrollados epitaxialmente tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, es decir una longitud de 30 a 46 nm y una anchura de 14 a 22 nm, que está impregnado con fibras de colágeno en una relación en peso de dichas fibras de colágeno a dicho material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso de al menos 2%.

30 Generalmente, la impregnación con fibras de colágeno tiene lugar en toda la superficie externa de la capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de HAP nanocristalino, incluyendo dentro de los poros, según se muestra mediante microscopía electrónica de barrido.

35 La relación en peso de dichas fibras de colágeno a dicho material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso es preferiblemente al menos 5%, en particular al menos 8%. Esa relación en peso es generalmente de 2 a 80%, preferiblemente de 5 a 50%, en particular de 8 a 25%.

Según una realización interesante, las fibras de colágeno son fibras de colágeno tipo I, colágeno tipo III o una de sus mezclas.

40 La capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino tiene generalmente un grosor de al menos 15 a 50 nm, preferiblemente al menos de 20 a 40 nm, más preferiblemente al menos de 25 a 35 nm. Ese grosor mínimo corresponde a una capa de nanocristales de HAP en orientación epitaxial.

El grosor de la capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino está conectado con la relación del material nuclear de CAP sinterizado al HAP, estando dicha relación generalmente entre 5:95 y 95:5, preferiblemente de 10:90 a 90:10.

5 Según una realización frecuentemente usada, el material nuclear de CAP sinterizado consiste esencialmente en TCP, prefiriéndose el  $\alpha$ -TCP.

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar el material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso anterior, que comprende las etapas de

10 (a) mezclar una suspensión de fibras de colágeno y un material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso que comprende un núcleo de CAP sinterizado y al menos una capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de HAP nanocristalino depositada sobre el núcleo de CAP sinterizado, en donde los nanocristales desarrollados epitaxialmente tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, es decir, una longitud de 30 a 46 nm y una anchura de 14 a 22 nm, y

(b) eliminar el agua mediante succión a vacío.

15 El material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso puede ser un cuerpo conformado de material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso o un material en partículas o granulado de CAP/HAP poroso.

20 Según una realización preferida, el material sustituto de hueso (CAP/HAP) poroso es un material en partículas o un granulado de material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso, actuando entonces también las fibras de colágeno impregnadas como un aglutinante entre las partículas o los gránulos, proporcionando así una matriz de colágeno porosa que rodea e impregna las partículas o los gránulos de material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso. Piezas cortadas de esa matriz muestran algunas propiedades elásticas que son ventajosas para su uso como implantes.

La mezclado de la etapa (a) es generalmente una mezclado vigorosa, realizándose la última convenientemente en el caso de la realización preferida anterior en un mezclador que tiene una paleta giratoria.

25 Preferiblemente, el procedimiento anterior comprende la etapa adicional de secar en un horno de vacío.

30 La presente invención también se refiere a un implante que comprende una matriz de colágeno porosa que rodea e impregna partículas o gránulos de material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso que comprende un núcleo de CAP sinterizado y al menos una capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de HAP nanocristalino depositada sobre el núcleo de CAP sinterizado, en el que los nanocristales desarrollados epitaxialmente tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, es decir una longitud de 30 a 46 nm y una anchura de 14 a 22 nm.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención sin limitar su alcance.

### Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de un material sinterizado en masa de  $\alpha$ -TCP

35 Para una mezcla de 500 g (peso seco), se mezclaron 360 g de polvo de fosfato dicálcico anhidro, 144 g de polvo de carbonato cálcico y 220 ml de agua desionizada durante 7 minutos a 500 rpm usando un agitador de laboratorio. La suspensión procedente del procedimiento de mezclado se transfirió inmediatamente a una cubeta de platino estable a las altas temperaturas. La cubeta de platino llena se puso en un horno frío. El horno se calentó hasta 40 1.400°C usando una velocidad de calentamiento de 60°C por hora. El proceso de calentamiento se detuvo después de 72 horas apagando el horno. La muestra se enfrió hasta temperatura ambiente dentro del horno. El material sinterizado en masa (fase  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> puro) se retiró del horno y la cubeta de platino. El producto en masa procedente del procedimiento de sinterización tenía un peso de 420 g (pérdida de peso 16,7%).

El control de la pureza de la fase se realizó usando análisis por difracción de rayos X del polvo.

45 Ejemplo 2 Preparación de gránulos porosos de  $\alpha$ -TCP sinterizado con un tamaño de partícula entre 0,25 y 2 mm

50 El producto en masa procedente del ejemplo 1 se machacó usando una machacadora de mordazas (tamaño de la ranura 4 mm). Los gránulos gruesos se tamizaron usando una máquina tamizadora y accesorios de tamizado con una abertura de malla de 2 mm y 0,25 mm. Después del tamizado las fracciones de gránulos se enjuagaron 2 veces usando agua purificada para separar residuos de polvo fino adsorbidos a los gránulos. Los gránulos porosos se secaron durante 10 horas a 120°C en una cabina de secado. El control de la distribución de los tamaños de partícula se realizó usando tecnología de difracción láser. La limpieza de las superficies de las partículas después de enjuagar se controló mediante observación de las superficies usando microscopía electrónica de barrido.

Ejemplo 3 Preparación de cilindros porosos (longitud 10 mm, diámetro 6 mm) de  $\alpha$ -TCP sinterizado mediante molienda CNC

5 El producto en masa procedente del ejemplo 1 se trituró hasta una pieza de trabajo cuboidal con longitudes de los bordes  $a=3$  cm,  $b=2$  cm,  $c=2$  cm usando una trituradora. La pieza de trabajo se puso y se fijó en una moledora CNC de 4 ejes equipada con una herramienta de corte de metal duro de cabeza redonda con un diámetro de 3 mm. Los cilindros se molieron usando una ruta de molienda helicoidal con un radio de 3 mm y una pendiente de 0,25 mm. La velocidad principal de la pieza de trabajo durante el procedimiento de molienda CNC era 1.700 rotaciones por minuto, la velocidad de rotación máxima de la ruta de molienda helicoidal se calculó mediante un procedimiento integral dentro del equipo de CNC y promedia 10 rotaciones por minuto. Después de la molienda las preformas cilíndricas se enjuagaron 2 veces usando agua purificada para separar residuos de polvo fino adsorbidos a la superficie de los cilindros. Los cilindros porosos se secaron durante 10 horas a 120°C en una cabina de secado. La limpieza de las superficies de las partículas después de enjuagar se controló mediante observación de las superficies usando microscopía electrónica de barrido. La corrección de las dimensiones de las preformas se controló usando un calibre.

Ejemplo 4 Preparación de un revestimiento de HAP nanocristalino desarrollado epitaxialmente sobre los gránulos de  $\alpha$ -TCP sinterizado procedentes del Ejemplo 2

20 Se preparó una solución tamponada (1.000 ml) adecuada para el proceso de revestimiento y transformación de fase usando 1,82 mol/l de sodio, 4,68 mol/l de hidrógeno, 0,96 mol/l de fósforo, 5,64 mol/l de oxígeno, 0,01 mol/l de calcio y 0,71 mol/l de cloro. La solución se ajustará hasta un pH de 7,4 a una temperatura de 40°C. Los gránulos producidos según el ejemplo 1 y 2 se sumergieron en la solución preparada y se almacenaron dentro de un baño de agua bien atemperado (40°C) durante un tiempo calculado según un grosor de la capa con una media de 250 nm (10 horas) que equivale a una composición de fases de (p/p) 75% de  $\alpha$ -TCP y 25% de hidroxiapatito. Después de la inmersión los gránulos se enjuagaron 3 veces mediante agua purificada para retirar residuos de la solución tamponada. Los gránulos porosos se secaron durante 4 horas a 120°C en una cabina de secado. La composición de fases de los gránulos se analizó mediante análisis de Rietveld de los datos de difracción de rayos X del polvo, los tamaños de los cristales de las fases cristalinas obtenidas mediante el procedimiento de revestimiento mediante el refinado de tamaño-deformación de los datos de difracción de rayos X según la técnica de Bragg. La porosidad de los gránulos se controló usando porosimetría de intrusión de mercurio, la morfología superficial después del revestimiento se controló usando microscopía electrónica de barrido.

Ejemplo 5 Preparación de un revestimiento de HAP nanocristalino desarrollado epitaxialmente sobre los cilindros de  $\alpha$ -TCP sinterizado del Ejemplo 3

35 Se preparó una solución tamponada (1.000 ml) adecuada para el proceso de revestimiento y transformación de fase usando 1,82 mol/l de sodio, 4,68 mol/l de hidrógeno, 0,96 mol/l de fósforo, 5,64 mol/l de oxígeno, 0,01 mol/l de calcio y 0,71 mol/l de cloro. La solución se ajustó hasta un pH de 7,4 a una temperatura de 40°C. Los cilindros porosos producidos según el ejemplo 1 y 3 se sumergieron en la solución preparada y se almacenaron dentro de un baño de agua bien atemperado (40°C) durante un tiempo calculado según un grosor de la capa con una media de 20  $\mu$ m (60 horas) que equivale a una composición de fases de aproximadamente 85% (p/p) de  $\alpha$ -TCP y 15% (p/p) de hidroxiapatito. Después de la inmersión los cilindros se enjuagaron 3 veces mediante agua purificada para retirar residuos de la solución tamponada. Los cilindros porosos se secaron durante 10 horas a 120°C en una cabina de secado. La composición de fases de los cilindros se analizó mediante análisis de Rietveld de los datos de difracción de rayos X del polvo, los tamaños de los cristales de las fases cristalinas obtenidas mediante el procedimiento de revestimiento se analizaron mediante el refinado de tamaño-deformación de los datos de difracción de rayos X según la técnica de Bragg. El crecimiento epitaxial se analizó usando espectroscopía de diferencia de reflectancia (RD, por sus siglas en inglés). La porosidad de los cilindros se controló usando porosimetría de intrusión de mercurio, la morfología superficial después del revestimiento se controló usando microscopía electrónica de barrido. El grosor de la capa se controló usando difracción electrónica de alta energía con reflexión (RHEED, por sus siglas en inglés) y/o espectroscopía fotoelectrónica (XPS).

Ejemplo 6 Influencia del tiempo de inmersión sobre el grosor de la capa y la composición de las fases

50 Las Tablas 2 y 3 muestran datos experimentales para un ejemplo que muestra la influencia del tiempo de inmersión sobre el grosor de la capa y la composición de las fases, respectivamente, para partículas de  $\alpha$ -TCP porosas con geometría casi esférica y un tamaño de 10 a 20  $\mu$ m, una porosidad de 25-40% en volumen, una superficie específica (interna) de 50-60 m<sup>2</sup>/g, una densidad aparente de 0,6-0,8 g/ml.

55

Tabla 2:

Influencia del tiempo de inmersión sobre el grosor de la capa

Tiempo de inmersión [min.]	Grosor de la capa* [nm]
0	--
15	37 (±10)
30	112 (±4)
60	121 (±9)
600	238 (±8)

5 \* La epitaxia, la composición química de la capa y el análisis del grosor de la capa se determinaron usando RHEED (difracción electrónica de alta energía con reflexión) y XPS (espectroscopía fotoelectrónica)

Tabla 3:

Influencia del tiempo de inmersión sobre la composición de fases

Tiempo de inmersión [h]	TCP** [% en peso]	HAP** [% en peso]
0	100	--
0,5	86,6 (±1)	13,4 (±2)
1	85,8 (±1)	14,2 (±3)
2	83,5 (±1)	16,4 (±3)
5	78,1 (±1)	21,9 (±3)
7,5	75,3 (±1)	24,7 (±3)
10	74,2 (±5)	25,8 (±2)
12	58,8 (±6)	41,2 (±7)
24	44,8 (±9)	55,2 (±6)
48	35,8 (±6)	64,2 (±3)
72	--	100

10 \*\* El análisis de fases cuantitativo se realizó usando el refinado de Rietveld de los datos de difracción de rayos X del polvo.

\*\*\* Los datos experimentales se evaluaron sobre un sistema con los siguiente parámetros: Fase líquida: PBS líquido salino tamponado, 20x, temperatura 40°C.

Ejemplo 7 Preparación de una suspensión de fibras de colágeno derivadas de piel de cerdo.

15 Se trituraron pieles porcinas en una trituradora de carne hasta trozos de 1 a 20 mm. El agua se retiró usando un disolvente soluble en agua tal como un alcohol o una cetona. Las fibras de colágeno se desengrasaron usando un hidrocarburo clorado tal como dicloroetano o cloruro de metileno o un hidrocarburo no clorado tal como hexano o

tolueno. Después de retirar el disolvente el colágeno se trató con una base inorgánica fuerte a un pH por encima de 12 durante un período de 6 a 24 horas y se trató con un ácido inorgánico fuerte a un pH de 0 a 1 durante un período de 1 a 12 horas. El exceso de ácido se retiró enjuagando con agua y la suspensión se homogeneizó hasta una suspensión homogénea al 0,5 a 2% de fibras de colágeno en presencia de un regulador del hinchamiento tal como una sal inorgánica. La suspensión se secó mediante liofilización y las fibras de colágeno secas se limpiaron sucesivamente con diferentes disolventes orgánicos tales como alcoholes, éteres, cetonas e hidrocarburos clorados, evaporándose a continuación los disolventes bajo vacío hasta un residuo de disolvente de menos de 1%. Se preparó una suspensión de fibras de colágeno mezclando con agua las fibras secas limpias obtenidas anteriormente.

5

10 Ejemplo 8            Preparación de una placa de material sustituto de hueso (CAP/HAP) poroso impregnado con fibras de colágeno

15 Se mezclaron a fondo durante 30 minutos 594,2 g de la suspensión de fibras de colágeno (correspondientes a aproximadamente 14,855 g de colágeno seco) preparada en el Ejemplo 7 y 119,7 g de gránulos porosos de material sustituto de hueso (CAP/HAP) preparado como se describe en el Ejemplo 5 y que tiene un tamaño de partícula entre 0,5 y 1,0 mm y la mezcla se vertió en un filtro de succión y se secó mediante succión. La placa de material sustituto de hueso (CAP/HAP) impregnado con fibras de colágeno se retiró cuidadosamente del filtro de succión y se secó en un horno de vacío a aproximadamente 35°C durante 48 horas. Se cortaron trozos de esa placa para las pruebas in vivo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso que comprende un núcleo de CAP sinterizado y al menos una capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de HAP nanocristalino depositada sobre el núcleo de CAP sinterizado, en el que los nanocristales desarrollados epitaxialmente tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, es decir una longitud de 30 a 46 nm y una anchura de 14 a 22 nm, que está impregnado con fibras de colágeno en una relación en peso de dichas fibras de colágeno a dicho material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso de al menos 2%.
- 10 2. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según la reivindicación 1, en el que la relación en peso de dichas fibras de colágeno a dicho material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso es al menos 5%.
3. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según la reivindicación 2, en el que la relación en peso de dichas fibras de colágeno a dicho material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso es al menos 8%.
- 15 4. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según la reivindicación 1, en el que la relación en peso de dichas fibras de colágeno a dicho material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso es de 8 a 25%.
5. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las fibras de colágeno son fibras de colágeno tipo I, colágeno tipo III o una de sus mezclas.
- 20 6. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la capa desarrollada epitaxialmente de HAP nanocristalino tiene generalmente un grosor de al menos 15 a 50 nm.
7. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la relación de material nuclear de CAP sinterizado a HAP está entre 5:95 y 95:5.
8. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la relación de material nuclear de CAP sinterizado a HAP está entre 10:90 y 90:10.
- 25 9. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el núcleo de CAP sinterizado consiste esencialmente en  $\alpha$ -TCP.
10. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende un material en partículas o un granulado de material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso impregnado con fibras de colágeno.
- 30 11. Un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende un cuerpo conformado de material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso impregnado con fibras de colágeno.
12. A procedimiento para preparar un material sustituto de hueso de CAP/HAP poroso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende
- 35 (a) mezclar una suspensión de fibras de colágeno y un material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso que comprende un núcleo de CAP sinterizado y al menos una capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de HAP nanocristalino depositada sobre el núcleo de CAP sinterizado, en donde los nanocristales desarrollados epitaxialmente tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, es decir, una longitud de 30 a 46 nm y una anchura de 14 a 22 nm, y
- 40 (b) eliminar el agua mediante succión a vacío.
13. Un procedimiento según la reivindicación 12, que comprende además la etapa adicional de secado en un horno de vacío.
- 45 14. Un implante que comprende una matriz de colágeno porosa que rodea e impregna partículas o gránulos de material sustituto de hueso de fosfato cálcico/hidroxiapatito (CAP/HAP) bifásico poroso que comprende un núcleo de CAP sinterizado y al menos una capa desarrollada epitaxialmente uniforme y cerrada de HAP nanocristalino depositada sobre el núcleo de CAP sinterizado, en donde los nanocristales desarrollados epitaxialmente tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, es decir una longitud de 30 a 46 nm y una anchura de 14 a 22 nm.