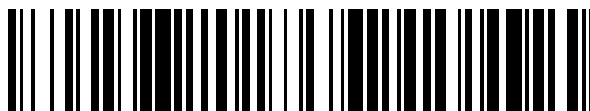


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 703**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2011 E 11794855 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2637709**

54 Título: **Implantes para sustituciones óseas que soportan carga que tienen una arquitectura organizada jerárquica que deriva de la transformación de estructuras vegetales**

30 Prioridad:

08.11.2010 IT MI20102070

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

03.07.2015

73 Titular/es:

**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
(100.0%)
Piazzale Aldo Moro, 7
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**TAMPIERI, ANNA;
SPRIO, SIMONE;
RUFFINI, ANDREA;
WILL, JULIA;
GREIL, PETER;
MÜLLER, FRANK;
MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, JULIAN;
TORRES RAYA, CARMEN;
VARELA FERIA, FRANCISCO MANUEL;
RAMÍREZ RICO, JOAQUÍN y
HARMAND, MARIE-FRANÇOISE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 539 703 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

Implantes para sustituciones óseas que soportan carga que tienen una arquitectura organizada jerárquica que deriva de la transformación de estructuras vegetales

5 La presente invención se refiere a un sustituto óseo biomórfico para la sustitución y regeneración de secciones de hueso sometidas a cargas mecánicas (que soportan carga).

10 El impacto social y económico de las enfermedades degenerativas que afectan al tejido óseo hace necesario desarrollar sustitutos óseos sintéticos que sean capaces de mostrar propiedades biofuncionales superiores, sobre todo en ortopedia, donde las operaciones quirúrgicas para la reconstrucción y la regeneración óseas están aumentando de forma constante e implican cada vez a pacientes jóvenes que siguen siendo activos. A este respecto, las propiedades biomecánicas requeridas para un sustituto óseo son particularmente importantes, para que éste promueva el desarrollo y la remodelación de nuevo tejido óseo bajo cargas mecánicas, minimizando el recurso a técnicas de fijación, mientras que al mismo tiempo sea integrado y reabsorbido en la medida de lo posible por el tejido óseo que se forma nuevamente.

15 Las destacables e insuperables propiedades biomecánicas del hueso natural son estrictamente una consecuencia de su morfología anisótropa que está organizada jerárquicamente en una gama de escalas desde dimensiones submicrométrica a la macroscópica, de modo que el tejido óseo sea capaz de adaptarse continuamente a los cambios en la carga mecánica. Sobre la base de estas tensiones continuas y variables, el hueso se remodela a sí mismo por medio de mecanismos en las células que actúan como sensores de variaciones en la presión del fluido extracelular debido a estímulos mecánicos. Dichos mecanismos permiten la eliminación del hueso dañado y su sustitución por nuevo tejido que tiene una morfología organizada y, por lo tanto, completamente funcional. Este mecanismo es de crucial importancia para la supervivencia del tejido óseo sometido a cargas mecánicas y puede activarse solamente en presencia de una estructura organizada jerárquicamente.

20 Hasta ahora, no se ha descubierto una solución óptima para la sustitución y regeneración de secciones de hueso sometidas a cargas mecánicas (que soportan carga), dado que no se conocen matrices de soporte óseo que sean tanto bioactivas/biorreabsorbibles como resistentes a las cargas mecánicas a las que ciertas secciones óseas del cuerpo están sometidas, tales como los huesos largos de la pierna o el brazo (por ejemplo el metatarso, el fémur, la tibia, el húmero y el radio).

25 Esta desventaja es superada por la presente invención, que pone a disposición un sustituto óseo para generación ósea en general y en particular para la regeneración de secciones de hueso preferentemente sometidas a cargas mecánicas (que soportan carga) tal como se perfila en las reivindicaciones adjuntas.

30 El sustituto óseo de la invención está provisto de una morfología organizada de manera jerárquica en las tres dimensiones espaciales. El sustituto óseo se obtiene partiendo de estructuras vegetales que muestran en sí mismas una estructura organizada jerárquicamente y un intervalo de porosidad compatible con los requisitos necesarios para un sustituto óseo, es decir, una macroporosidad capaz de permitir colonización y proliferación celulares y la formación de un árbol de vascularización apropiado, interconectada con una microporosidad capaz de permitir el intercambio de fluidos nutrientes y aquellos que contienen productos de desecho del metabolismo celular.

35 Dichas estructuras vegetales se transforman en materiales bioactivos/biorreabsorbibles inorgánicos por medio de procesos térmicos y químicos adecuados, mientras mantienen su estructura y morfología originales. Estos dispositivos, que gracias a su naturaleza se definen como biomórficos (es decir, reproducen en detalle la estructura de un material natural), pretenden imitar el comportamiento mecánico *in vivo* del hueso y, debido a su composición química, que reproduce bien la del hueso natural, son capaces de inducir las mismas respuestas a nivel celular, guiando la formación, proliferación y maduración de nuevo tejido óseo.

40 Al mismo tiempo, el sustituto óseo de la invención es capaz de mostrar un comportamiento biomecánico tal como ser capaz de ser usado para sustituciones y regeneración de secciones de hueso sometidas a cargas mecánicas (que soportan carga), tales como por ejemplo los huesos largos de la pierna y el brazo. El sustituto óseo de la invención también puede utilizarse para la sustitución y regeneración de secciones de hueso que no están sometidas a cargas mecánicas. De hecho, el sustituto es adaptable a cualquier necesidad de regeneración.

45 La invención se describe en el presente documento en detalle también con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 50
- La figura 1 es un dibujo esquemático de una realización particular del sustituto óseo biomórfico de la invención;
 - La figura 2 es un diagrama de bloques que ilustra las posibles realizaciones del sustituto biomórfico de la invención;
 - 55 - La figura 3 muestra fotografías grabadas a lo largo del tiempo de la microestructura de SiC (carburo de silicio) después de la eliminación del exceso de silicio;

- La figura 4 es una fotografía de la cubierta de SiC de acuerdo con una realización de la invención en la que la cubierta tiene una forma cilíndrica hueca;
- La figura 5 muestra la resistencia a la compresión de varias muestras de SiC;
- La figura 6 es una fotografía de una cubierta de SiC antes (izquierda) y después (derecha) de la deposición de un revestimiento compuesto de hidroxiapatita (HA)/colágeno;
- La figura 7 muestra una imagen de microscopio electrónico de transmisión (TEM) que atestigua la nucleación de cristales de HA nanométricos sobre fibras de colágeno mediante deposición por electroforesis;
- La figura 8 muestra los resultados de la espectroscopia XPS de las superficies de cubiertas de SiC, en las que se resalta la formación de grupos COO^- después del ataque con ácido; los grupos COO^- sirven para coordinar los iones de calcio durante el proceso de revestimiento por medio de inmersión en fluido corporal simulado (SBF);
- La figura 9 muestra los resultados de la espectroscopia FTIR de la superficie de cubiertas de SiC, en la que se resalta la formación de grupos Coo^- después del ataque con ácido; los grupos COO^- sirven para coordinar los iones de calcio durante el proceso de revestimiento por medio de inmersión en SBF;
- La figura 10 es una fotografía de la microestructura de una cubierta de SiC revestida con una capa de hidroxiapatita biomimética por medio de inmersión en SBF (después de que la superficie había sido sometida a ataque con ácido tal como se especifica en las dos figuras precedentes);
- La figura 11A muestra un sustituto óseo completo de acuerdo con la invención, en el que la cubierta es de SiC y el núcleo es colágeno mineralizado con hidroxiapatita sustituida por carbonato y magnesio;
- La figura 11B muestra un sustituto óseo completo de acuerdo con la invención, en el que la cubierta es de SiC y el núcleo es hidroxiapatita biomimética sustituida por carbonato;
- La figura 12 muestra una radiografía de un implante biomimético en un defecto crítico en un hueso metatarsiano de oveja, resaltando la osteointegración de la cubierta de SiC;
- La figura 13 muestra las secciones histológicas de un implante biomimético en un defecto crítico en un hueso metatarsiano de oveja, resaltando la osteointegración de la cubierta de SiC;
- La figura 14 muestra la Microtomografía computarizada (micro-CT) de un implante de HA biomimética obtenido de madera de ratán en hueso trabecular en la zona distal de un fémur de conejo, resaltando la perfecta osteointegración de la matriz de soporte en el hueso circundante.

Los inventores de la presente solicitud de patente han descubierto sorprendentemente que encapsulando una matriz de soporte biomimética a base de hidroxiapatita (HA) obtenida de una madera que tiene porosidad alta (o una matriz de soporte a base de fibras de colágeno e hidroxiapatita) en una cubierta biomimética a base de hidroxiapatita (HA) o carburo de silicio (SiC) obtenida de una madera que tiene porosidad reducida, se obtiene un sustituto óseo que tiene propiedades de resistencia mecánica así como las características de bioactividad y/o biorreabsorbabilidad. El sustituto óseo puede emplearse, por lo tanto, para la sustitución y la regeneración de secciones óseas sometidas a cargas mecánicas (que soportan carga), pero también de secciones óseas no sometidas a cargas mecánicas. Dichas secciones de hueso son los huesos largos de la pierna y el brazo, por ejemplo la tibia, el metatarso, el fémur, el húmero y el radio.

Por lo tanto, el sustituto óseo de la invención comprende un núcleo, a base de hidroxiapatita (HA), obtenido de al menos una madera porosa (o a base de colágeno e hidroxiapatita) y una cubierta, a base de hidroxiapatita (HA) o carburo de silicio (SiC), obtenida de al menos una madera que tiene una porosidad menor que al menos una madera del núcleo.

La madera utilizada para el núcleo puede definirse como una madera que tiene porosidad alta, donde porosidad alta se entiende como una porosidad total de entre el 60% y el 95%, preferentemente entre el 65% y el 85%.

Preferentemente, la madera que tiene porosidad alta comprende una cantidad de poros anchos que varía entre el 35% y el 70%, preferentemente entre el 40% y el 65% de la cantidad total de poros. Dichos poros preferentemente tienen un diámetro que varía entre 70 y 400 μm , preferentemente entre 80 y 300 μm . Son ejemplos de maderas que tienen porosidad alta madera de ratán, pino, abachi y balsa.

La madera utilizada para la cubierta puede definirse como una madera que tiene porosidad reducida, donde porosidad reducida se entiende como una porosidad de entre el 20% y el 60%, preferentemente entre el 30% y el 50%.

Son ejemplos de maderas que tienen porosidad reducida sipo, roble, palisandro y kempas.

El núcleo a base de colágeno e hidroxiapatita preferentemente comprende fibras de colágeno mineralizadas con hidroxiapatita biomimética. En lo sucesivo en esta divulgación, hidroxiapatita biomimética se entiende como hidroxiapatita parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, preferentemente carbonato, magnesio, silicio y/o estroncio, más preferentemente carbonato y magnesio o solamente iones de carbonato.

El núcleo, que deriva de estructuras de madera que tienen porosidad alta, o de una estructura de colágeno mineralizado con HA sustituida iónicamente, simula la parte esponjosa interna del hueso natural, mientras que la cubierta que deriva de maderas que tienen porosidad reducida y resistencia mecánica elevada, simula la parte cortical del hueso.

5 En una realización de la invención, la cubierta está revestida con una fina capa a base de hidroxiapatita (HA) y/o colágeno, para incrementar la adhesión y la proliferación celular y, por lo tanto, la osteointegración en el tejido óseo circundante.

10 Preferentemente, dicha capa comprende colágeno mineralizado con HA o HA sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, preferentemente carbonato, magnesio, silicio y/o estroncio, más preferentemente iones de carbonato (HA biomimética).

15 El núcleo a base de hidroxiapatita que deriva de maderas que tienen porosidad alta preferentemente comprende hidroxiapatita parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, preferentemente iones de carbonato, magnesio, silicio y/o estroncio, más preferentemente iones de carbonato, o una mezcla bifásica que comprende hidroxiapatita sustituida iónicamente y β -fosfato tricálcico (beta-TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Como alternativa, el núcleo puede comprender un compuesto híbrido que comprende colágeno mineralizado con hidroxiapatita biomimética.

20 La cubierta a base de hidroxiapatita que deriva de maderas que tienen porosidad reducida preferentemente comprende hidroxiapatita biomimética, o una mezcla bifásica que tiene hidroxiapatita biomimética y β -fosfato tricálcico (beta-TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Como alternativa, la cubierta que deriva de maderas que tienen porosidad reducida preferentemente comprende carburo de silicio.

25 En una realización preferida, cuando se utiliza una cubierta de carburo de silicio, dicha cubierta está revestida con una capa bioactiva de colágeno mineralizado con hidroxiapatita biomimética o de hidroxiapatita biomimética en solitario.

30 De hecho, aunque el carburo de silicio es un material inerte no tóxico, al mismo tiempo no facilita la adhesión y la proliferación celulares. Por lo tanto, la utilización de carburo de silicio no revestido podría ralentizar la consolidación del hueso.

35 En otra realización, dicha capa de revestimiento también puede aplicarse en el caso en el que la cubierta comprende HA parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, o una mezcla bifásica de HA y beta-TCP, para promover aún más la reconstrucción de hueso natural. En este caso, la aplicación del revestimiento se lleva a cabo preferentemente por medio de inmersión en SBF (tal como describe a continuación en el presente documento). De hecho, de esta manera, se obtendría un enriquecimiento de la cubierta con iones útiles para la regeneración ósea.

40 Las diversas tipologías de cubierta enumeradas anteriormente en el presente documento pueden emparejarse con las diversas tipologías de núcleo indicadas anteriormente, de acuerdo con la aplicación deseada, particularmente de acuerdo con la resistencia mecánica requerida. Un perfil de las diversas realizaciones del sustituto óseo de la invención se da en la figura 2. Para aplicaciones que requieren resistencia mecánica elevada (por ejemplo en el caso de reconstrucción de un fémur o metatarso), el uso de un sustituto óseo que comprende un núcleo de una cualquiera de las tipologías descritas anteriormente y una cubierta de carburo de silicio es preferible. En este caso, es preferible revestir la cubierta con una capa bioactiva de colágeno mineralizado con HA biomimética o de HA biomimética en solitario.

50 En una realización, el sustituto óseo comprende un núcleo de colágeno mineralizado con HA parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea (HA biomimética), y una cubierta de carburo de silicio.

55 En otra realización, el sustituto óseo comprende un núcleo de mezcla bifásica de HA/beta-TCP y una cubierta de SiC.

En otra realización, el sustituto óseo comprende un núcleo que consta de colágeno mineralizado con HA biomimética y una cubierta de HA biomimética o de mezcla bifásica de HA/beta-TCP.

60 En el caso en el que la cubierta consta de SiC, es preferible revestirla con una capa de material bioactivo, tal como colágeno mineralizado con HA biomimética, o HA biomimética, preferentemente obtenido con el método de inmersión en SBF. El sustituto óseo de la invención puede prepararse en cualquier forma deseada, que puede variar de acuerdo con la aplicación específica para la que está siendo empleada. La figura 1 ilustra una realización preferida de la invención, en el que el núcleo tiene una forma de cilindro macizo, mientras que la cubierta es un cilindro que tiene una sección hueca en su interior de una forma correspondiente al cilindro del núcleo, y de dimensiones que le permitan alojar al propio núcleo.

La cubierta se prepara de acuerdo con los métodos descritos a continuación en el presente documento en una forma cilíndrica hueca adecuada para alojar al núcleo que, a su vez, puede prepararse como un cilindro macizo que se inserta en la cavidad de la cubierta. Como alternativa, el núcleo puede insertarse dentro de la cavidad cilíndrica de la cubierta en forma de gel y liofilizarse más tarde para un perfecto llenado de la cavidad. Como alternativa, el núcleo puede liofilizarse y a continuación introducirse en la cavidad cilíndrica de la cubierta.

La cubierta del sustituto óseo es de un grosor que varía de acuerdo con la aplicación específica, pero en cualquier caso, que varía entre 1 y 5 mm, preferentemente entre 2 y 4 mm.

El núcleo del sustituto óseo es también de un grosor que varía de acuerdo con la aplicación específica. El grosor de todo el dispositivo está hecho a medida en base al defecto óseo a corregir. Considerando que el grosor de la cubierta se mantiene en un mínimo (véase anteriormente), el grosor del núcleo se define como resultado.

La capa que reviste la cubierta puede ser de un grosor de entre 40 y 100 μm , preferentemente entre 50 y 80 μm . El núcleo y la cubierta de hidroxiapatita parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, particularmente con iones de magnesio, silicio y/o estroncio, más preferentemente el ion carbonato, o de una mezcla bifásica de HA parcialmente sustituida y beta-TCP, puede obtenerse por medio de dos métodos diferentes: a través de un proceso de transformación de etapas múltiples o a través de un método sol-gel.

El proceso de transformación de etapas múltiples es conocido en el sector, por ejemplo mediante la publicación de Tampieri A, Sprio S, Ruffini A, Celotti G, Lesci IG, Roveri N. From Wood to Bone: multi-step process to convert wood hierarchical structures into biomimetic hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. J Mater Chem 2009; 19 (28): 4973-4980.

Dicho proceso comprende las siguientes etapas:

1) Pirólisis de madera nativa: una madera que tiene porosidad alta (por ejemplo, ratán o pino) o una madera que tiene porosidad reducida (por ejemplo, sipo o roble) se calienta a una temperatura de entre 800 y 2000°C, en una atmósfera inerte para permitir la descomposición y la eliminación de todas las sustancias orgánicas. A partir de este proceso, se obtiene un material de carbono.

2) Carburación: el material de carbono se infiltra con calcio en estado de vapor a una temperatura de 1500-1700°C en una atmósfera inerte, transformándolo en carburo de calcio de acuerdo con la siguiente reacción: $2\text{C} + \text{Ca} \rightarrow \text{CaC}_2$.

3) Oxidación: el material de carburo de calcio se oxida completamente a una temperatura de 900-1100°C de acuerdo con la reacción: $2\text{CaC}_2 + 5\text{O}_2 \rightarrow 2\text{CaO} + 4\text{CO}_2$.

4) Carbonatación: el material de óxido de calcio se carbonata completamente a temperaturas de entre 400°C y 850°C de acuerdo con la reacción: $\text{CaO} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CaCO}_3$.

5) Fosfatación: el material de carbonato cálcico se transforma completamente en hidroxiapatita parcialmente sustituida por carbonato por medio de tratamiento con una sal de fosfato, por ejemplo, fosfato potásico.

La sustitución por iones diferentes de carbonato puede obtenerse introduciendo sales solubles adecuadas que contienen los iones de interés enumerados anteriormente, en el entorno de reacción del proceso de fosfatación.

El método de preparación de etapas múltiples puede comprender también opcionalmente una etapa adicional que consta de tratamiento térmico, en la que la hidroxiapatita parcialmente sustituida por iones carbonato se transforma parcialmente en β -fosfato tricálcico. De esta manera, se forma una mezcla bifásica de hidroxiapatita parcialmente sustituida y beta-TCP. Dicha composición es particularmente preferida tanto para el núcleo como para la cubierta, dado que tiene mejor bioactividad y biorreabsorbabilidad, con respecto a hidroxiapatita sustituida en solitario, así como propiedades de resistencia mecánica superiores. Preferentemente, el tratamiento térmico se lleva a cabo dentro de un intervalo de temperatura de 700-900°C, preferentemente en una atmósfera de CO_2 .

Como alternativa al método de transformación de etapas múltiples, la cubierta y el núcleo de hidroxiapatita biomimética pueden obtenerse por medio de un método sol-gel. Una madera que tiene porosidad alta (por ejemplo, ratán o pino) o una madera que tiene porosidad reducida (por ejemplo, sipo o roble) se infiltra con un precursor que contiene fosfito (o fosfato) y/o nitratos. Después de la infiltración, se prepara un gel a una temperatura de entre 100 y 150°C; a continuación a esto le sigue pirolización y calcinación para eliminar toda la parte orgánica, dejando un material cerámico poroso que imita la estructura de la madera original.

Para obtener hidroxiapatita sustituida, los iones de sustitución enumerados anteriormente se dispersan en la solución inicial por medio del uso de sales solubles.

En el caso del método de producción de sol-gel, no está previsto un método de tratamiento térmico destinado a formar la mezcla bifásica de HA parcialmente sustituida y beta-TCP. Dicha mezcla puede obtenerse solamente con el método de etapas múltiples.

Un método sol-gel se desvela en la publicación de C. Eichenseer, J. Will, M. Rampf, S. Wend, P. Greil Biomorphous porous hydroxyapatite-ceramics from rattan (Calamus Rotang). J Mater Sci: Mater Med (2010) 21: 131-137.

5 El núcleo que comprende colágeno mineralizado con HA parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, preferentemente iones de carbonato, magnesio, silicio y/o estroncio, más preferentemente iones de carbonato y magnesio, se obtiene usando un proceso conocido en el sector, por ejemplo de las publicaciones de patente EP1447104, WO2007045954 y WO2006092718.

10 El material compuesto comprende fibras de colágeno autoensambladas y mineralizadas con hidroxiapatita sustituida por iones relevantes para la estimulación de la regeneración ósea (iones de carbonato, magnesio, silicio, estroncio). El compuesto híbrido se reticula con productos apropiados (por ejemplo, genipina, éter diglicídico de glutaraldehído butanodiol, etc.) para mejorar la porosidad, la microestructura y las propiedades mecánicas. Dicho material se caracteriza por porosidad alta y bioactividad que determinan cinética de reabsorción adecuada y la formación de nuevo tejido óseo bien organizado.

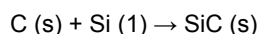
15 El material compuesto se inserta en la cavidad de la cubierta en forma de gel y se liofiliza más tarde para el perfecto llenado de la cavidad.

20 La cubierta de carburo de silicio se obtiene por medio de un proceso de infiltración de la madera pirolizada con silicio en estado líquido, seguido por eliminación del exceso de silicio por medio de un ataque químico adecuado y lavado final para eliminar todos los restos de sustancias químicas residuales. Este material, que es bioinerte y bien tolerado por el cuerpo, preserva la morfología y la porosidad típicas de la estructura original de la madera. Esto permite la habitación y la proliferación celulares, junto con suficiente resistencia mecánica, típica de materiales a base de carburo de silicio, lo que permite su uso en zonas de implante que están sometidas a cargas mecánicas. La resistencia mecánica de este dispositivo también está determinada por su microestructura organizada jerárquicamente, que es típica de sustancias de origen natural, haciendo posible conseguir el mejor y más eficaz compromiso entre ligereza y resistencia mecánica, superior a la de otros materiales con un volumen similar de porosidad obtenida artificialmente. El cilindro hueco está realizado manteniendo un grosor adecuado de la pared externa con el objetivo de obtener las propiedades requeridas de resistencia mecánica.

25 Más específicamente, el precursor de madera que tiene porosidad reducida se somete en primer lugar a un ciclo de pirólisis a una temperatura de hasta 1000°C en una atmósfera inerte (no oxidante). Durante la pirólisis, los componentes orgánicos de la madera (celulosa, lignina, etc.) se descomponen, dejando un esqueleto de carbono que reproduce las características morfológicas de la madera original.

35 La muestra pirolizada se trabaja a continuación mecánicamente para obtener la forma y las dimensiones deseadas; por ejemplo, puede reducirse a un cilindro hueco de dimensiones adecuadas.

40 La muestra pirolizada se filtra a continuación con silicio en estado líquido y al vacío, para permitir la penetración del silicio en los poros y su reacción con el carbono para formar carburo de silicio de acuerdo con la reacción:



45 La transformación en carburo de silicio tiene lugar a una temperatura final de entre 1300 y 1600°C.

El material resultante tiene silicio metálico residual en los poros. Con el fin de eliminarlo, la muestra se somete a ataque químico con ácidos fuertes, tales como ácido fluorhídrico y/o ácido nítrico. A esto le sigue una eventual etapa de lavado, en la que se eliminan residuos de los ácidos. El lavado se lleva a cabo preferentemente con una solución de H₃BO₃.

50 Una cubierta hecha de SiC u otro material puede revestirse con una capa de material biomimético para mejorar la afinidad celular y promover la osteointegración. El revestimiento biomimético puede llevarse a cabo por medio de dos procesos: electrodeposición de colágeno mineralizado y deposición de una capa de HA, preferentemente mediante inmersión en fluido corporal simulado (SBF).

55 En electrodeposición, se emplea una célula de doble electrodo, siendo un electrodo una fina lámina de metal, preferentemente de platino, y el otro, la cubierta a revestir.

60 El proceso de electrodeposición tiene lugar preferentemente a una corriente constante predeterminada y con una serie de fases de revestimiento que varían de acuerdo con la microestructura y el grosor que se desea obtener.

El líquido en el que tiene lugar el proceso de electrodeposición comprende una mezcla de dos soluciones, las fuentes de calcio y fósforo, respectivamente, y una suspensión de colágeno.

En las condiciones mencionadas anteriormente en el presente documento, una película uniforme de colágeno mineralizado se forma sobre la superficie de la cubierta, cuya microestructura y grosor dependen de los parámetros utilizados.

5 Como alternativa al método de electrodeposición, en el caso de que se desee realizar una capa de HA sustituida, la capa de material biomimético se realiza por medio de cristalización de una capa de HA después de la inmersión en fluido corporal simulado (SBF), que contiene iones relevantes para la promoción de procesos de regeneración ósea (iones de magnesio, silicio, etc.). Como una etapa preliminar, la cubierta se somete a ataque con un ácido fuerte, preferentemente con una solución de ácido nítrico y ácido clorhídrico. La cubierta se sumerge a continuación en una solución de iones Ca^{2+} que se unen a la superficie de la cubierta. La posterior inmersión en SBF enriquecido permite la formación de una capa continua HA sustituida iónicamente.

15 El sustituto óseo de la invención tiene características de bioactividad y biorreabsorbabilidad combinadas con características de resistencia mecánica que le hacen particularmente adecuado para la sustitución y la regeneración de secciones de hueso sometidas a cargas mecánicas, por ejemplo para los huesos largos de la pierna y el brazo (por ejemplo, la tibia, el fémur, el metatarso, el húmero, el radio, etc.)

Ejemplos

20 Preparación de un núcleo de hidroxiapatita parcialmente sustituida por iones carbonato.

Método de transformación de etapas múltiples:

1) Pirólisis de madera nativa

25 La madera de ratán se seca en un calentador a 70°C durante 24 horas y a continuación se calienta térmicamente hasta 1000°C en una atmósfera inerte para permitir la descomposición y la eliminación de todas las sustancias orgánicas. A partir de este proceso, se obtiene un material de carbono.

30 2) Carburación

El material de carbono se infiltra con calcio en estado de vapor a una temperatura de $1500\text{-}1650^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera inerte, transformándolo en carburo de calcio de acuerdo con la siguiente reacción:



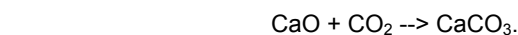
3) Oxidación

El material de carburo de calcio material se oxida completamente en un horno a una temperatura de $900\text{-}1100^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora de acuerdo con la reacción:



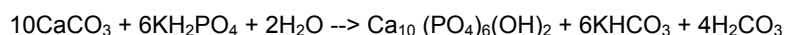
4) Carbonatación

45 El material de óxido de calcio se carbonata completamente en un horno a temperaturas que superan 750°C en una atmósfera de CO_2 o a presión de CO_2 o en una autoclave a una temperatura de 400°C con una presión de CO_2 de 2,2 MPa durante 24 horas, de acuerdo con la reacción:



5) Fosfatación

El material de carbonato cálcico se transforma completamente en hidroxiapatita parcialmente sustituida por carbonato en condiciones ambiente ($T < 100^{\circ}\text{C}$, 1 atm de presión) o condiciones hidrotérmicas a $T = 200^{\circ}\text{C}$, presión de 1,2 MPa durante 24 horas, de acuerdo con la siguiente reacción:



Dicha fórmula es un ejemplo, dado que pueden emplearse diferentes fuentes de fosfato.

60 El dispositivo obtenido de este modo muestra una morfología, una porosidad y una resistencia mecánica compatibles con las características del hueso esponjoso.

Método sol-gel:

65

5 El núcleo del sustituto óseo también se prepara usando el método sol-gel. La madera de ratán se infiltra con un precursor que contiene fosfito de trietilo y nitrato de calcio tetrahidratado en una solución hidroalcohólica (agua/etanol). La relación molar de agua con respecto a fósforo se mantiene igual a 8 para conseguir la completa hidrólisis y una relación de Ca con respecto a P igual a 1,67 (la de HA). La solución se deja envejecer durante 2 horas a 60°C hasta que se vuelve transparente.

10 La madera nativa se purifica en primer lugar de las resinas que tienen bajo peso molecular por medio de extracción con un aparato Soxhlet con una mezcla de toluol y etanol (2:1) durante 17 horas. A continuación las muestras se secan a 105°C durante 24 horas antes de realizar una segunda extracción usando etanol durante 19 horas.

Después de esto, las muestras se mantienen en agua destilada hirviendo durante varias horas y se secan a 105°C durante 24 horas.

15 La infiltración se lleva a cabo al vacío en un vaso de precipitados que contiene el sol (dispersión de partículas coloidales en fase líquida); después de la infiltración, las muestras se dejan secar durante varias horas a 80°C para permitir la formación del gel. El proceso de infiltración puede repetirse para incrementar la cantidad de HA.

20 Las muestras se someten a pirólisis a continuación a 800°C durante 1 h en una atmósfera de nitrógeno. Finalmente, la matriz de carbono se elimina sinterizando a 1300°C.

Dicho proceso de transformación hace posible obtener una hidroxiapatita biomórfica, es decir, la transformación de una estructura de madera en una estructura de hidroxiapatita que también mantiene la morfología original de la madera.

25 Preparación de una cubierta de carburo de silicio

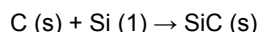
Una cubierta de SiC puede obtenerse de acuerdo con el proceso indicado en las publicaciones de patente P200102278 y PCT/ES02/00483.

30 La madera de sipo se somete en primer lugar a un ciclo de pirólisis que implica:

- 35 1) secar la madera a 75°C durante 24 h y a 120°C durante 24 h;
2) calentar a 1000°C en una atmósfera inerte (no oxidante) durante un periodo de 30 minutos, durante el cual los componentes orgánicos de la madera (celulosa, lignina, etc.) se descomponen, dejando un esqueleto de carbono que reproduce las características morfológicas de la madera original.

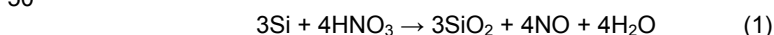
La muestra pirolizada se trabaja a continuación mecánicamente para obtener la forma y las dimensiones deseadas; en este caso, se reduce a un cilindro hueco de dimensiones adecuadas.

40 La muestra pirolizada se infiltra a continuación con silicio en estado líquido y al vacío, para permitir la penetración del silicio en los poros y su reacción con el carbono para formar carburo de silicio de acuerdo con la reacción:

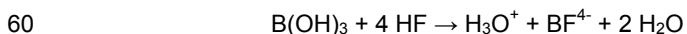


45 Las condiciones requeridas para conseguir el material de SiC son: calentamiento a 5°C/min y temperatura final de 1550°C mantenida durante 30 minutos.

El material resultante tiene silicio metálico residual en los poros. Con el fin de eliminarlo, la muestra se somete a ataque químico de acuerdo con el siguiente perfil de reacciones:



El proceso de lavado se basa en el uso de hidróxido de boro y permite la eliminación de los residuos de ácido fluorhídrico por medio de conversión en una especie soluble:



La figura 3 muestra la microestructura de SiC después de la eliminación del exceso de silicio. Esta imagen muestra cómo el ataque con ácido gradualmente libera los poros de la presencia de silicio metálico residual.

65 La figura 4 es una fotografía de la cubierta de SiC obtenida con el método descrito y a la que se le ha dado una forma cilíndrica hueca.

La figura 5 muestra los valores de resistencia a la compresión de las muestras de SiC obtenidas con el método.

5 Preparación del compuesto híbrido (fibras de colágeno mineralizado con HA sustituida por iones de carbonato y magnesio) como el núcleo.

10 A una suspensión de hidróxido cálcico (1,47 g en 300 cc de agua) que también contiene otros iones de interés (utilizando sales solubles adecuadas de magnesio, silicio, estroncio, etc.) se le añade una solución de ácido ortofosfórico (1,17 g en 200 cc de agua) cargada con 50 g de una suspensión de colágeno en ácido acético al 1%, a 25°C. La nucleación de la fase de apatita sobre colágeno tiene lugar a un pH de 9-12 y, preferentemente, a 35°C.

15 El agente reticulante (por ejemplo éter diglicídico de 1,4-butanodiol) se añade por inmersión del compuesto en 2,5 mm de agente durante 48 horas. Generalmente, se desea la consecución de relaciones específicas de agente reticulante con respecto a compuesto (en este caso el 1% en peso). Después de este tratamiento, la construcción se lava, se filtra y se inserta en la cavidad del cilindro de SiC en forma de gel y se liofiliza después para el perfecto llenado de la cavidad. Como alternativa, la construcción puede liofilizarse y a continuación introducirse en la cavidad del cilindro de SiC.

20 Preparación de una cubierta de SiC revestida con película bioactiva.

El revestimiento biomimético se lleva a cabo mediante dos métodos: electrodeposición de colágeno mineralizado y deposición de una capa de HA biomimética, mediante inmersión en fluido corporal simulado (SBF).

Método de electrodeposición

25 El revestimiento se consigue por electrodeposición en una célula de doble electrodo, siendo un electrodo una fina lámina de platino, y el otro, la cubierta de SiC.

30 El proceso tiene lugar a una temperatura constante predeterminada (por ejemplo T ambiente), dentro de un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo 15 minutos), a una corriente constante predeterminada (por ejemplo 34 mA) y con un número de fases de revestimiento que difiere de acuerdo con la microestructura y el grosor que se desea obtener.

35 El líquido en el que tiene lugar el proceso de electrodeposición consta de una mezcla de dos soluciones, las fuentes de calcio (por ejemplo, nitrato cálcico, 42 mM) y fósforo (por ejemplo, fosfato de amonio monobásico, 25 mM), respectivamente, más una suspensión de colágeno preparada a partir de tendones de Aquiles equinos, por medio del método desarrollado por Opocrin S.p.A (documento WO 0209790).

40 En las condiciones mencionadas anteriormente, una película uniforme de colágeno mineralizado se forma sobre la superficie del SiC, cuya microestructura y grosor dependen de los parámetros utilizados.

La figura 6 muestra la cubierta en forma de cilindro antes y después del revestimiento con la película de colágeno mineralizado con hidroxiapatita de acuerdo con el método descrito.

45 La figura 7 muestra la presencia de cristales de HA nanométricos sobre fibras de colágeno, tal como se obtiene con el método descrito.

Método con SBF

50 La funcionalización de la superficie de los cilindros en BioSiC se consigue por medio de la cristalización de una capa de HA después de la inmersión en fluido corporal simulado (SBF), que contiene iones relevantes para la promoción de los procesos de regeneración ósea (magnesio, silicio, etc.).

55 Como una etapa preliminar, la superficie de los cilindros se somete a ataque con ácido por medio de una solución de HNO₃/HCl, que da como resultado la formación de iones de COO⁻. El cilindro se sumerge a continuación en una solución de cloruro cálcico de modo que la superficie activada previamente pueda unirse a los iones de Ca²⁺ presentes en la solución. La posterior inmersión en SBF enriquecido permite la formación de una capa continua de HA sustituida iónicamente.

60 La figura 8 muestra los resultados de la espectroscopia XPS de las superficies de cubiertas de SiC, en las que se resalta la formación de grupos COO⁻ después de ataque con ácido; los grupos COO⁻ sirven para coordinar los iones de calcio durante el proceso de revestimiento por medio de inmersión en SBF.

65 La figura 9 muestra los resultados de la espectroscopia FTIR de la superficie de cubiertas de SiC, en las que se resalta la formación de grupos COO⁻ después de ataque con ácido; los grupos COO⁻ sirven para coordinar los iones de calcio durante el proceso de revestimiento por medio de inmersión en SBF.

La figura 10 muestra la microestructura del SiC revestido con la película bioactiva de hidroxiapatita biomimética obtenida a partir de SBF.

5 La figura 11 muestra el sustituto óseo ensamblado de la invención; un núcleo de HA/colágeno y una cubierta de SiC son observables en la fotografía A, mientras que un núcleo de HA sustituida y una cubierta de SiC son observables en la fotografía B.

10 Los sustitutos óseos biomórficos muestran una morfología orientada y anisótropa y, por lo tanto, su resistencia mecánica cambia considerablemente en las dos direcciones. Por ejemplo, las cubiertas de SiC derivadas de roble rojo y sipo tienen una resistencia a la compresión de 150 y 50 MPa, en las direcciones longitudinal y transversal, respectivamente. Las matrices de soporte de HA biomimética derivadas de ratán, por ejemplo, muestran una resistencia a la compresión de 4-5 y aproximadamente 1 MPa, respectivamente.

15 Las imágenes de pruebas *in vivo* llevadas a cabo en una oveja (figuras 12-13) y conejo (figura 14) muestran, respectivamente, la osteointegración de la cubierta de SiC derivada de sipo y la osteointegración del núcleo de HA biomimética obtenido con el método de etapas múltiples (figura 14).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sustituto óseo biomórfico que tiene una morfología organizada de manera jerárquica en las tres dimensiones espaciales, comprendiendo el sustituto óseo un núcleo biomórfico, a base de hidroxiapatita (HA), obtenido de al menos una madera porosa, y una cubierta biomórfica, a base de hidroxiapatita (HA) o carburo de silicio (SiC), obteniéndose dicha cubierta de al menos una madera que tiene una porosidad menor que la al menos una madera del núcleo.
- 10 2. El sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha al menos una madera porosa tiene una porosidad total de entre el 60% y el 95%, preferentemente entre el 65% y el 85%.
- 15 3. El sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha al menos una madera porosa es madera de ratán, pino, abachi y balsa.
- 20 4. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha al menos una madera de la cubierta tiene una porosidad de entre el 20% y el 60%, preferentemente entre el 30% y el 50%.
- 25 5. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha al menos una madera de la cubierta es madera de sipo, roble, palisandro y kempas.
- 30 6. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho núcleo a base de hidroxiapatita que deriva de al menos una madera porosa comprende hidroxiapatita parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, preferentemente carbonato, magnesio, silicio y/o estroncio, más preferentemente carbonato, o una mezcla bifásica que comprende hidroxiapatita sustituida iónicamente y β -fosfato tricálcico (beta-TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).
- 35 7. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha cubierta a base de hidroxiapatita comprende hidroxiapatita parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, o una mezcla bifásica que comprende hidroxiapatita sustituida iónicamente y β -fosfato tricálcico (beta-TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).
- 40 8. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha cubierta comprende carburo de silicio,
- 45 9. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha cubierta está revestida con una capa a base de hidroxiapatita (HA) y/o colágeno.
- 50 10. El sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha capa comprende colágeno mineralizado con hidroxiapatita parcialmente sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea, o comprende hidroxiapatita sustituida por iones relevantes para la estimulación de procesos de regeneración ósea.
- 55 11. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha cubierta tiene un grosor de entre 1 y 5 mm, preferentemente entre 2 y 4 mm; dicha capa que reviste la cubierta tiene un grosor de entre 40 y 100 μm , preferentemente entre 50 y 80 μm .
12. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho núcleo tiene una forma de cilindro macizo, mientras que dicha cubierta es un cilindro que tiene una sección hueca en su interior de una forma correspondiente al cilindro del núcleo y de dimensiones que le permiten alojar al propio núcleo.
13. El sustituto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en la sustitución y la regeneración de hueso.
14. El sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación 13, para uso en la sustitución y la regeneración de secciones óseas sometidas a cargas mecánicas (que soportan carga).
15. El sustituto óseo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dichas secciones óseas son huesos largos de la pierna y el brazo, preferentemente la tibia, el metatarso, el fémur, el húmero o el radio.

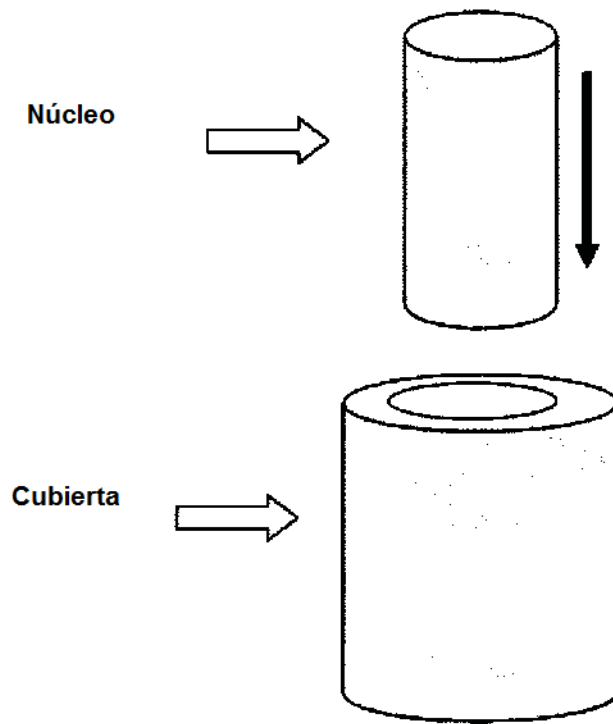


Fig. 1

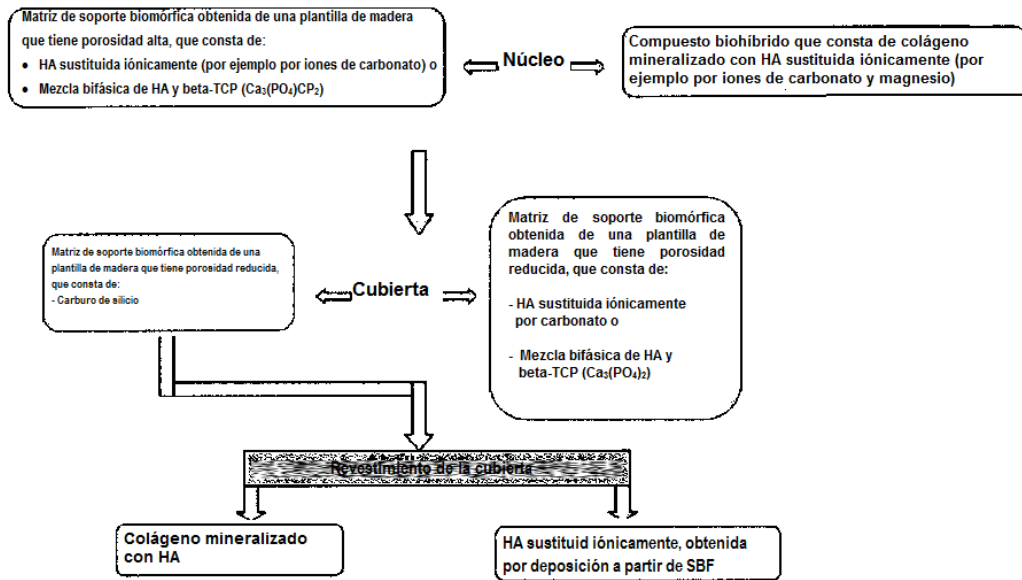


Fig. 2

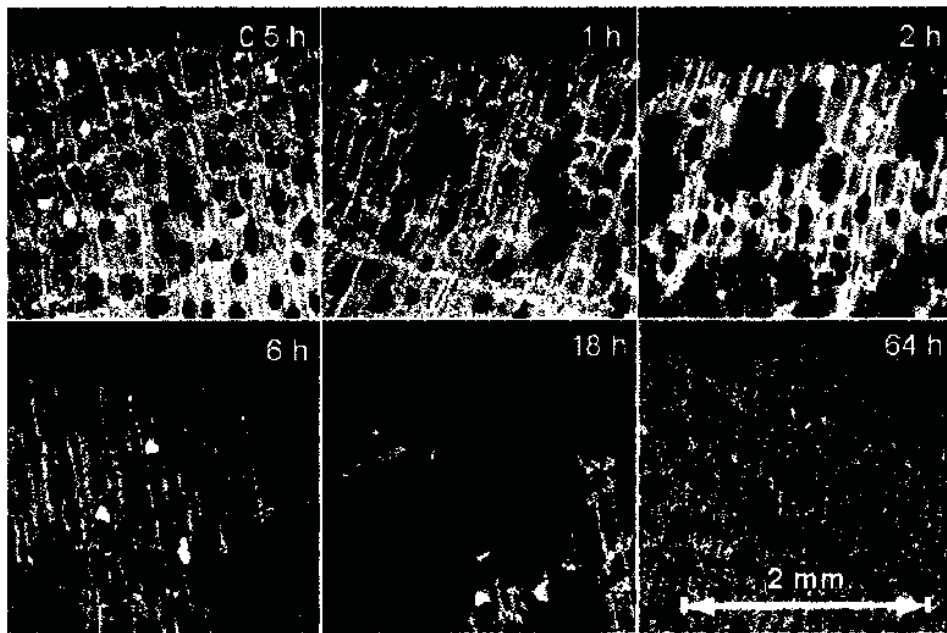
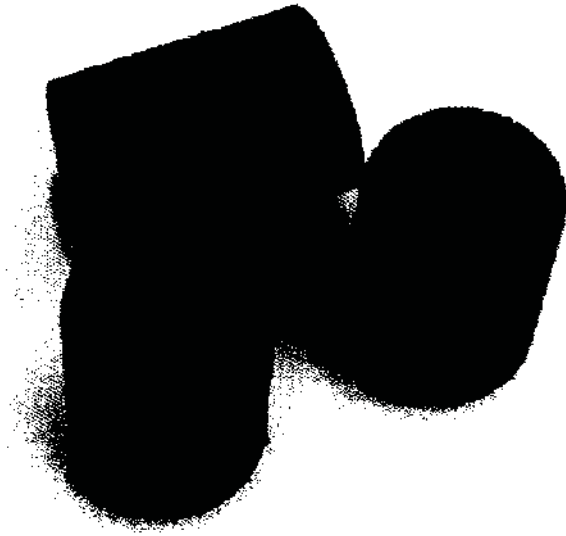


Fig. 3



Fig, 4

Material	Deformación (%)	Resistencia(GPa)
bioSiC AL00A	11-16	1,6 ± 0,2*
bioSiC EN01A	11-12	1,6 ± 0,1
bioSiC QU02A	7-9	1,0 ± 0,1

Fig. 5

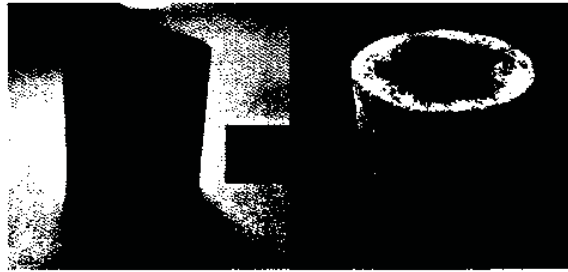


Fig. 6



Fig. 7

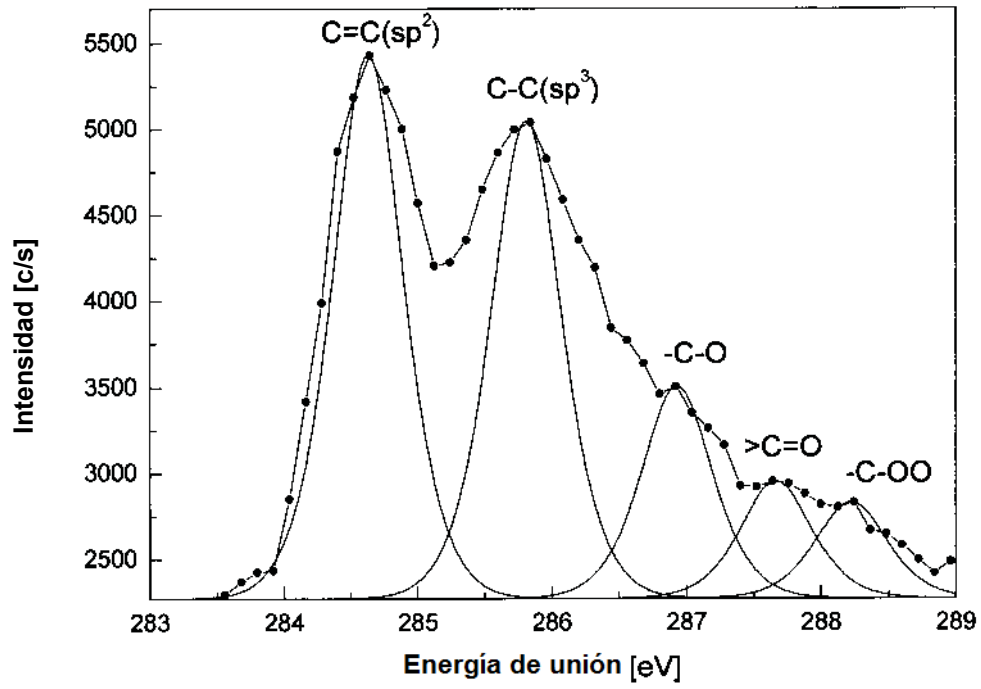


Fig. 8

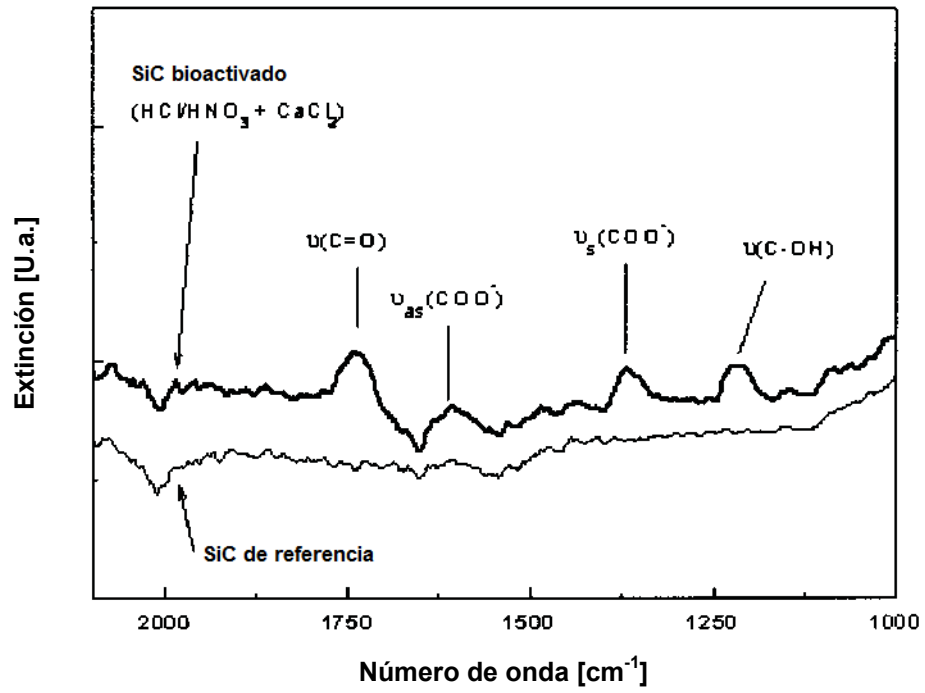


Fig. 9

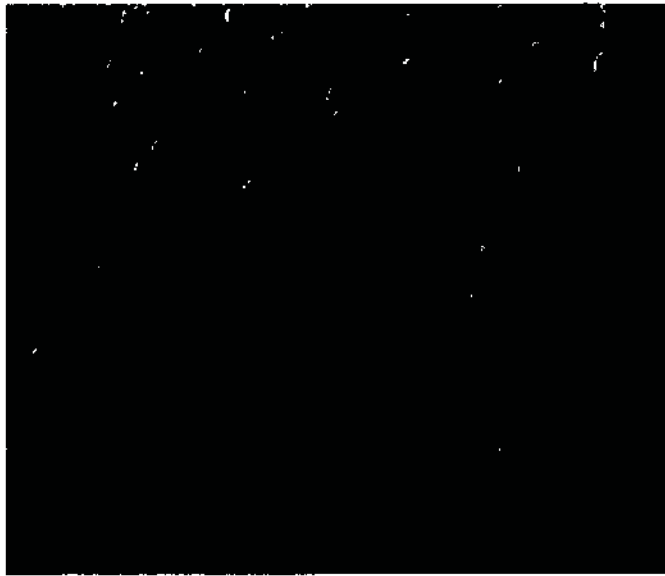
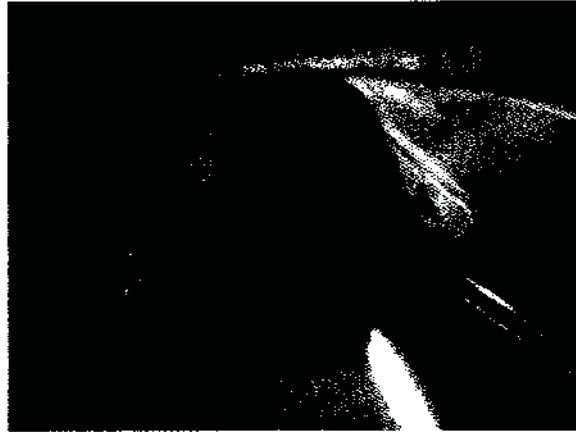


Fig. 10



A



B

Fig. 11

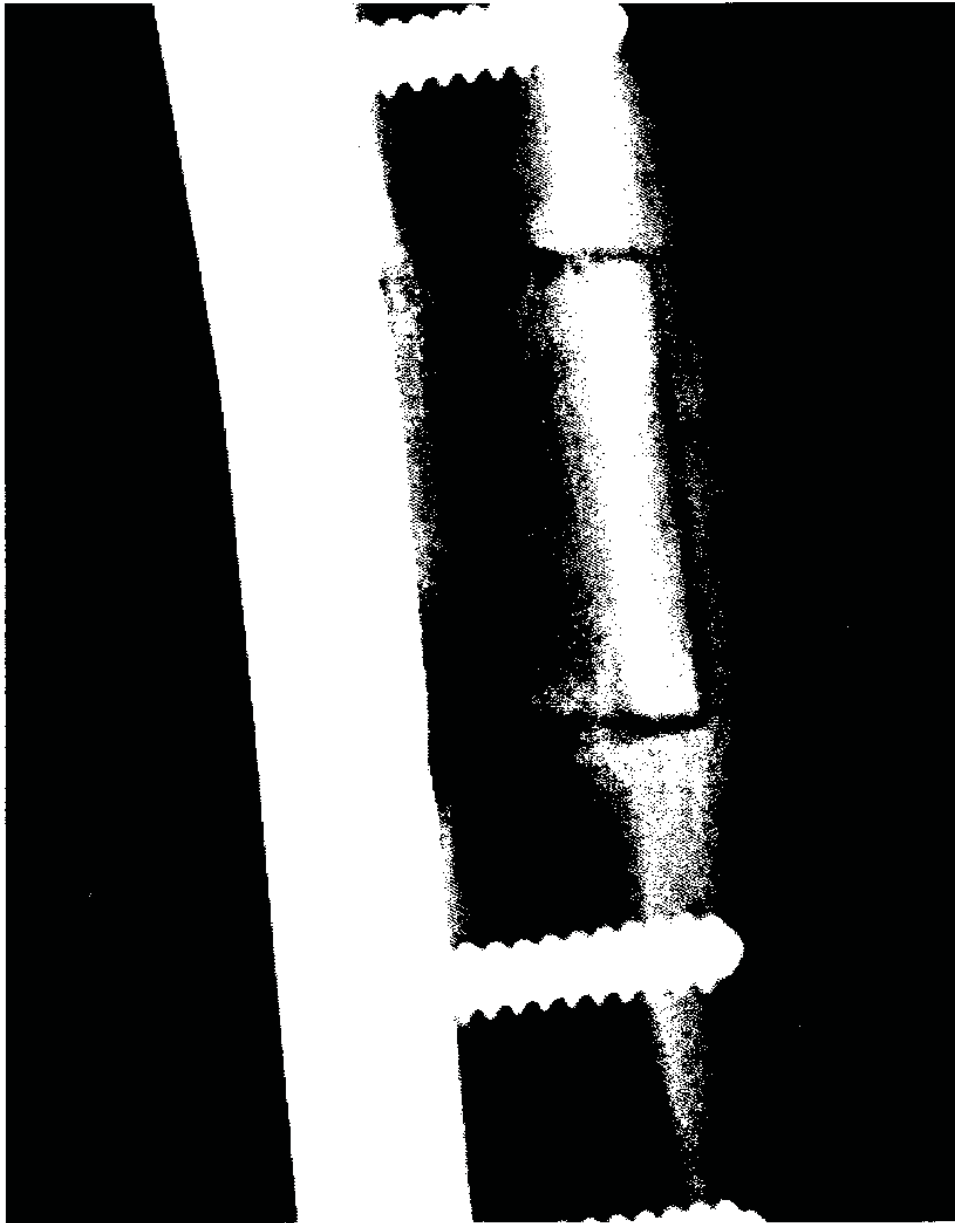


Fig. 12



Fig. 13

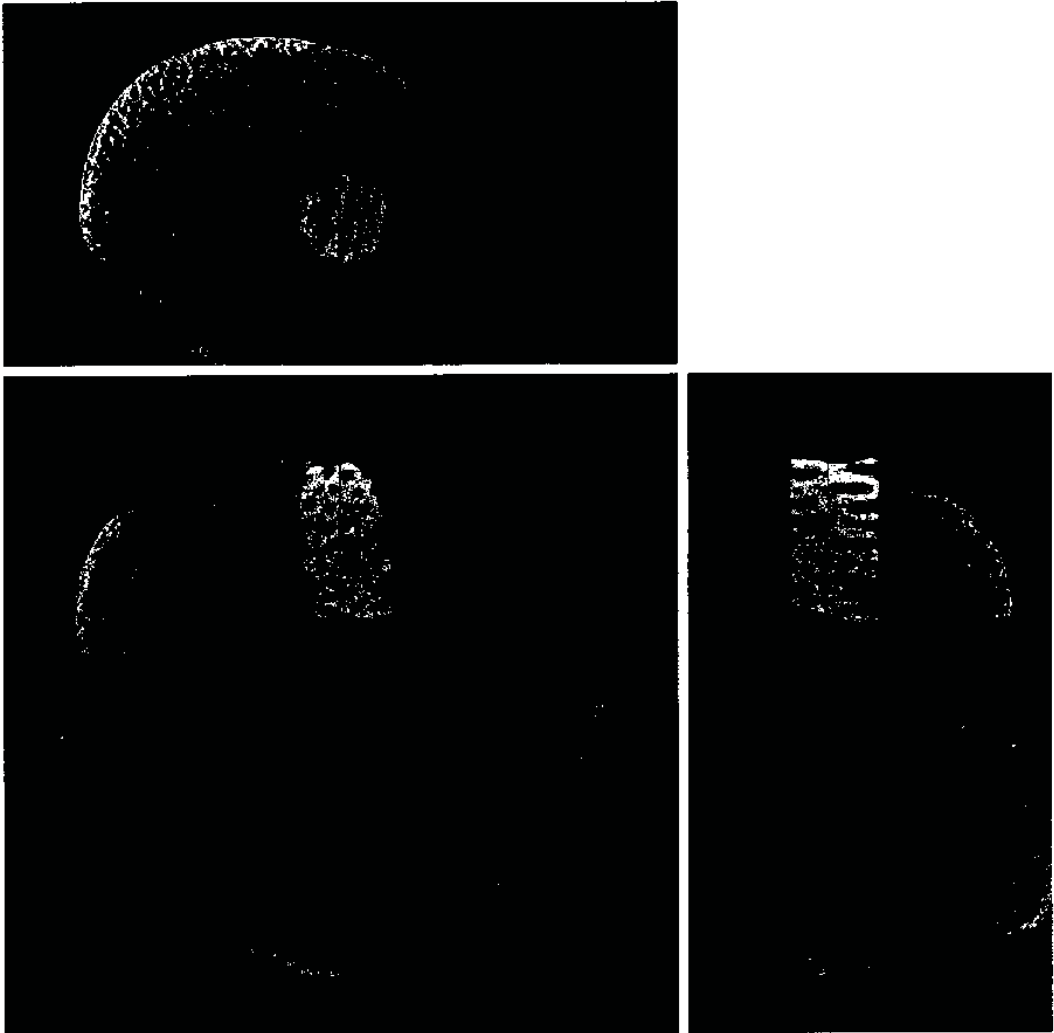


Fig. 14