

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 906**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2013 E 13744439 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2879726**

54 Título: **Grupo fosfato hidrófilo que contiene material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado**

30 Prioridad:

31.07.2012 EP 12005559

31.07.2012 EP 12005560

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

03.12.2015

73 Titular/es:

GEISTLICH PHARMA AG (100.0%)

Bahnhofstrasse 40

6110 Wolhusen, CH

72 Inventor/es:

IMHOF, CORNEL;

SCHLÖSSER, LOTHAR;

SCHÄFER, BIRGIT y

BUFLER, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 552 906 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

Grupo fosfato hidrófilo que contiene material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen natural que tiene una capacidad de succión definida de una solución isotónica y que contiene un grupo fosfato apto para actuar como precursor de la hidroxiapatita y un proceso para la preparación de ese material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo.

Antecedentes de la invención

Un sitio con un defecto óseo puede ser el resultado de una infección, una enfermedad, un traumatismo, una malformación durante el desarrollo del tumor, cirugía u otros factores. Con frecuencia, es necesario generar un volumen óseo de cierto tamaño, por ejemplo para aumentar una mandíbula enferma. En esos casos preferentemente se usa un injerto sólido que además se puede estabilizar. Los materiales de relleno en forma particulada están limitados a pequeñas cavidades a medida que la curación se produce de forma natural, siempre que no haya movimiento o se produzca un movimiento muy limitado entre un segmento separado y el hueso circundante.

Se conocen varias técnicas, tales como el uso de materiales de relleno o injertos de origen natural o sintético, para sustituir partes enfermas o ausentes. Debido a su arquitectura natural el hueso es muy poroso. En general, el material de sustitución ósea intenta mimetizar la química y microestructura del hueso humano. Ciertos parámetros físico-químicos tales como la cristalinidad, solubilidad, tamaño de partícula, porosidad, estructura del poro y tamaño del poro del material son de importancia fundamental y pueden influir enormemente en la compatibilidad ósea y la integración del hueso. Una combinación inapropiada de estos parámetros da lugar al fallo en la reparación ósea. Es sabido que los tamaños de poro influyen en los procesos de crecimiento y proliferación celular, de vascularización, y/o de adhesión celular. En vista de estos hallazgos, se puede enfatizar que el material de sustitución ósea de origen natural tiene algunas ventajas importantes sobre materiales sintéticos. A pesar de que, de forma generalizada se considera que el hueso autógeno es el tratamiento convencional, su aplicación tiene varios inconvenientes y tanto los huesos autógenos como alógenos solo están disponibles en cantidades limitadas.

En los últimos años mucha de la atención se ha centrado en la conservación de las propiedades biomecánicas del hueso animal mientras que, a la vez, se satisfacen los rigurosos requerimientos normativos biológicos y fisicoquímicos para el desarrollo de materiales de sustitución ósea de origen animal.

Un material de sustitución ósea disponible en el mercado es TUTOBONE®, que es un bloque de hueso esponjoso bovino (disponible en Tutogen Medical). Se trata de un trasplante óseo deshidratado parcialmente purificado en el que se mantiene en gran medida la resistencia mecánica nativa.

La patente de Estados Unidos n.º 6.942.961 describe un método en dos etapas para la deshidratación de tejidos biológicos para producir trasplantes con una estructura ósea conservada tal como TUTOBONE®. En una primera etapa, el tejido se deshidrata parcialmente con un disolvente orgánico miscible en agua. En una segunda etapa, el tejido se vuelve a deshidratar mediante criodeseccación.

El TUTOBONE®, al igual que otros materiales de sustitución ósea deshidratados parcialmente purificados de origen animal disponibles en el mercado con una estructura ósea y una resistencia mecánica conservadas, no proporciona unas características de hidrofilia e integración ósea satisfactorias. Para superar la baja hidrofilia de bloques óseos de origen animal disponibles en el mercado, el cirujano debe enjuagar los bloques óseos con solución salina fisiológica antes o durante la cirugía. Dichos bloques óseos se deben humedecer poniéndolos, por ejemplo, en una jeringa vacía y se deben enjuagar varias veces con solución salina fisiológica. Esto consume tiempo y es poco práctico en un entorno quirúrgico u hospitalario. Además, no se puede garantizar que dichos bloques óseos tratados se humecten completamente y no contengan burbujas de aire. Dichas burbujas de aire pueden impedir una integración rápida del material de sustitución ósea. En la interfase aire a sangre, no es posible crecimiento ni regeneración. La conexión estructural y funcional directa entre el tejido vivo circundante y el material de sustitución ósea es insuficiente. La sangre, los componentes de la sangre, y las células del paciente deben integrar rápidamente el material injertado después de su implantación.

Así, existe la necesidad de un material de sustitución ósea deshidratado parcialmente purificado de origen animal con una estructura ósea y una resistencia mecánica conservadas que tenga una hidrofilia suficiente para que se pueda mojar y rehidratar fácilmente.

La patente de Estados Unidos n.º 6.293.970 y el documento US2010/0030340 desvelan un injerto óseo plastificado de soporte de carga que comprende un injerto óseo de soporte de carga no desmineralizado limpio (es decir, parcialmente purificado) que está impregnado con uno o más plastificantes, los plastificantes que son en particular

sacáridos tales como glucosa, sacarosa y D-galactosa, y polioles C₂ a C₇ tales como glicerol, adonitol, sorbitol, ribitol, galactitol, manitol y xilitol, y el injerto óseo que es "cualquier hueso o una de sus partes obtenidos a partir de un donante, por ejemplo, un ser humano o un animal y/o un donante cadáver". El término "plastificado" aquí significa que las aguas de hidratación unidas libres y sueltas en el tejido óseo se sustituyen con un plastificante sin alterar la orientación de las fibras de colágeno y de la fase mineral asociada, conservando así la estructura y las propiedades mecánicas del hueso natural. Se enseña que se debe usar el plastificante para estabilizar el injerto óseo y así prevenir el desarrollo o la propagación de fracturas o microfracturas durante el almacenamiento, durante la implantación o después de la implantación, y para prevenir el riesgo de transmisión de enfermedades: No se hace ninguna mención al uso del plastificante como agente humectante, sin que estos documentos aborden en absoluto la cuestión de la hidrofilia del injerto óseo. En la patente de Estados Unidos n.º 6.293.970 se desvela que el plastificante se usa del 3 % al 30 % en peso/peso de hueso y que permite que el injerto óseo se implante directamente en un paciente después de únicamente un breve lavado en solución salina isotónica estéril para eliminar el "plastificante asociado a las superficies inmediatas de los injertos" o después de un lavado prolongado (una hora aproximadamente) con solución salina isotónica para eliminar "tanto plastificante como sea posible" (véase en particular la columna 8, líneas 14-62 y columna 12, líneas 10-27). En el documento US2010/0030340, se desvela que el plastificante se usa en "cantidades mínimas", que aquí significa la cantidad mínima para sustituir las aguas de hidratación en los tejidos óseos, usando una composición plastificante que contiene más del 70 % (peso/peso) de plastificante, con la opción de implantar el injerto plastificado sin rehidratación, o aclarar rápidamente el implante en solución salina isotónica estéril antes de su implantación (véase, en particular [0035] y [0126]), de esta forma como en la patente de Estados Unidos n.º 6.293.970 eliminando únicamente el plastificante asociado a las superficies externas del injerto.

En los documentos de patente de Estados Unidos anteriores, el plastificante sustituye un agua natural de hidratación sin alterar la orientación de las fibras de colágeno y la fase mineral asociada. Así se encuentra embebida en la estructura del injerto óseo y por tanto es difícil de eliminar mediante el lavado con una solución salina isotónica estéril antes de su implantación. La cantidad efectiva de plastificante que permanece en el material plastificado parcialmente purificado después de un enjuagado rápido con solución salina isotónica es difícil de evaluar. Probablemente, cuando el plastificante no se encuentra en exceso con respecto al agua natural de hidratación sustituida, la mayor parte del plastificante presente permanece en el material plastificado parcialmente purificado. El plastificante *in vivo* solo será eliminado lentamente por lavado por los fluidos fisiológicos.

La posible falta de tolerancia del paciente al material de sustitución ósea, una estructura extraña introducida en su cuerpo, siempre es un problema potencial en la implantación clínica, en particular si el material de sustitución ósea contiene una gran cantidad de aditivo tal como plastificante o agente humectante que es una sustancia no fisiológica.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen natural apto para que se pueda humectar e hidratar fácilmente, que no tenga los inconvenientes de los materiales de sustitución ósea de la técnica anterior, en concreto los de la patente de Estados Unidos n.º 6.942.961 (TUTOBONE®) y los de las patentes de Estados Unidos n.º 6.293.970 y US2010/0030340, y que presenta una nueva capacidad de formación ósea mejorada dentro del andamiaje del material de sustitución ósea.

El objetivo se consigue con la invención como se define en las reivindicaciones anexas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen natural, en el que esencialmente se elimina todo el material orgánico no colagenoso mientras que esencialmente se conservan la estructura ósea inorgánica porosa y la estructura colagenosa de hueso natural, caracterizado por que el material de sustitución ósea contiene del 0,05 al 1,5 % en peso/peso de al menos un sacárido o un alcohol de azúcar, y del 0,7 al 5,6 % en peso/peso de un grupo fosfato seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , este grupo fosfato que es parte de una sal fisiológicamente aceptable que es tampón de fosfato sódico.

Esta invención además proporciona un proceso para la preparación del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con la realización anterior que comprende las etapas de: (a) suministrar un material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural mediante la extracción en primer lugar de lípidos con disolventes orgánicos, tratando así el material deslipidizado con una solución que contiene un agente caotrópico y realizar un lavado exhaustivo con agua, (b) empapar el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado de origen natural en una solución que contiene el 0,05-0,85 % en peso/peso de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar, proporcionando así hidrofilia al material de sustitución ósea parcialmente purificado, y 10-1000 mM de un grupo fosfato seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , este grupo fosfato que es parte de un tampón de fosfato sódico, (c) criodesecar el material de sustitución ósea parcialmente purificado hidrófilo empapado, realizando con ello la deshidratación, y (d) esterilizar el material de sustitución ósea crio-desecado parcialmente purificado hidrófilo.

La invención también proporciona el uso del 0,7 al 5,6 % en peso/peso de un grupo fosfato apto para reaccionar con los iones de calcio de fluidos fisiológicos para proporcionar un precursor de hidroxiapatita seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , este grupo fosfato que es parte de un tampón de fosfato sódico, para potenciar la capacidad de formación de hueso nuevo de un material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural a partir del cual esencialmente se elimina todo material orgánico no colagenoso mientras que la estructura ósea inorgánica porosa y la estructura colagenosa del hueso natural se conservan esencialmente, que contiene del 0,05 al 1,5 % en peso/peso de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar.

Como se muestra con un ensayo de succión de una solución isotónica (véase en particular Ejemplo 3 y Figuras 1A y 1B), el material de sustitución ósea parcialmente purificado de la invención es hidrófilo y así es apto para su integración inmediata en el tejido circundante sin el riesgo de formar burbujas de aire. Gracias a su bajo contenido de sacárido o de alcohol de azúcar, una sustancia no fisiológica perturbará mínimamente el funcionamiento del cuerpo humano y así será tolerada óptimamente por el paciente.

Como se muestra con los experimentos *in vitro* de incubación de un bloque del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado en un medio similar a fluidos fisiológicos que contienen iones de calcio (véase en particular Ejemplo 4 y Figura 2), el grupo fosfato liberado reacciona con los iones de calcio para formar un precipitado blanco de fosfatos de calcio sobre fibrillas de colágeno del bloque, estos fosfatos de calcio que son precursores de la hidroxiapatita. Esto demuestra que *in vivo*, como en sistemas naturales (véase S. Gajjeraman et al. 2007 The Journal of Biological Chemistry 282, 2, pp. 1 193-1204 y S. Bodhak et al. 2009 Acta Biomaterialia 5, pp. 2178-2188), la nucleación y el crecimiento de los productos minerales óseos tendrá lugar sobre la matriz de colágeno del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo, con el grupo fosfato que desempeña un papel en estos procesos.

Así, el grupo fosfato desempeña un papel importante en la promoción de la formación de hueso. Tras su implantación en diversos animales, en particular en ratas y perros, el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de la invención muestra una excelente capacidad de formación de hueso nuevo con ninguno o muy pocos acontecimientos histopatológicos adversos (reacciones inflamatorias o a cuerpos extraños).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra una comparación de la capacidad de succión de una solución isotónica (captación de líquido en miligramos) en correlación con el tiempo para 8 bloques diferentes de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen equino que contiene el 0,35 % en peso/peso de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- según la presente invención, 3 bloques diferentes de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado de origen natural de acuerdo con la técnica anterior, y material de sustitución ósea bovino disponible en el mercado TUTOBONE® (Tutogen Medical GmbH).

La Figura 1B muestra la capacidad de succión relativa de una solución isotónica (relación en peso/peso entre la captación de líquido y el bloque deshidratado expresada en %) en correlación con el tiempo para 8 bloques diferentes de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen equino que contiene el 0,35 % en peso/peso de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- según la presente invención, comparado con 3 bloques diferentes de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado de origen natural de acuerdo con la técnica anterior, y material de sustitución ósea bovino disponible en el mercado TUTOBONE® (Tutogen Medical GmbH).

La Figura 2 muestra una micrografía SEM (microscopía electrónica de barrido) de la superficie de un bloque de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen equino que contiene el 0,35 % en peso/peso de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- según la presente invención, después de su incubación en DMEM (Medio de Eagle modificado de Dulbecco) que contiene el 10 % de FCS (suero fetal bovino).

La Figura 3 ilustra esquemáticamente un bloque de hueso de acuerdo con una realización.

La Figura 4 ilustra esquemáticamente una clavija de hueso de acuerdo con una realización.

La Figura 5 ilustra esquemáticamente una placa de hueso de acuerdo con una realización.

La Figura 6 ilustra esquemáticamente una llave cónica de hueso de acuerdo con una realización.

La Figura 7 ilustra esquemáticamente una barra de hueso de acuerdo con una realización.

La Figura 8 ilustra esquemáticamente gránulos de hueso de acuerdo con una realización.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la presente invención, con el término de "origen natural" se quiere decir cualquier material de sustitución ósea, es decir, hueso o material de tipo óseo, que procede de vertebrados que incluyen, pero no están limitados a, todo tipo de mamíferos tales como seres humanos, vacas, caballos, cerdos, etc. y cualquier hueso o material de tipo óseo que procede de invertebrados, tales como corales. En ciertas realizaciones, para los fines de la presente invención se usa hueso bovino, porcino o equino.

Con el término "material de sustitución ósea parcialmente purificado" se quiere decir cualquier material de sustitución ósea del cual se elimina todo material orgánico no colagenoso mientras que la estructura ósea inorgánica porosa y la estructura colagenosa se conservan esencialmente.

El término "hidrófilo" significa que el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado se puede mojar con agua, por tanto se puede rehidratar fácilmente mediante la absorción de una solución isotónica o un fluido fisiológico, y así no presenta riesgo de formar burbujas de aire cuando se implanta.

El término "sacárido" en particular incluye hexosas tales como glucosa, manosa o galactosa; pentosas tales como ribosa o arabinosa; cetosas tales como ribulosa o fructosa; disacáridos tales como sacarosa, lactosa o maltosa, oligosacáridos como ciclodextrina. El sacárido puede estar presente en forma D o en forma L. Ciertas realizaciones utilizan glucosa.

Los alcoholes de azúcares incluidos en la invención son en particular sorbitol, maltitol, lactitol manitol y xilitol. Ciertas realizaciones utilizan sorbitol.

El término "grupo fosfato que es apto para reaccionar con los iones de calcio de fluidos fisiológicos para proporcionar un precursor de hidroxiapatita" significa cualquier grupo fosfato que, en el cuerpo humano por reacción con los iones de calcio de fluidos fisiológicos, en particular de la sangre, preferentemente a un pH de 6,0 a 8,0 y una temperatura de 36 a 38 °C, es propenso a proporcionar un precursor de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, la más estable termodinámicamente y menos soluble de las sales de calcio que es un componente esencial de los huesos.

El tampón de fosfato sódico se usa como sal fisiológicamente aceptable, con los grupos fosfato aptos para reaccionar con los iones de calcio de fluidos fisiológicos aptos para proporcionar un precursor de hidroxiapatita que son entonces HPO_4^{2-} y H_2PO_4 .

El grupo fosfato contenido en ese material, que es apto para reaccionar con los iones de calcio de fluidos fisiológicos para proporcionar un precursor de hidroxiapatita y que preferentemente se selecciona del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4 , desempeña un papel importante en la promoción de la formación de hueso.

Se ha demostrado que después de la incubación *in vitro* de un bloque del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de la invención durante 72 horas en un medio similar a fluidos fisiológicos que contienen iones de calcio, en concreto DMEM (Medio de Eagle modificado de Dulbecco) que contiene el 10 % de FCS (suero fetal bovino), el grupo fosfato reacciona con los iones de calcio para formar un precipitado blanco de fosfatos de calcio sobre fibrillas de colágeno que eran visibles por análisis SEM (véase Figura 2). Se demostró que ese precipitado contiene dos tipos de fosfatos de calcio de morfologías diferentes, ambos que se pueden describir como precursores de hidroxiapatita.

Esos experimentos *in vitro* (véase Ejemplo 4) proporcionan una fuerte indicación de que *in vivo*, como en sistemas naturales (véase S. Gajjeraman et al. 2007 The Journal of Biological Chemistry 282, 2, pp. 1 193-1204 y S. Bodhak et al. 2009 Acta Biomaterialia 5, pp. 2178-2188), la nucleación y el crecimiento de los productos minerales óseos tendrá lugar sobre la matriz de colágeno del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo, el grupo fosfato contenido en este último que se libera en los fluidos fisiológicos desempeñando un papel en dichas reacciones. Con su bajo contenido de sustancia no fisiológica, el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de la invención se encontrará en situación de mimetizar sistemas naturales cuando se implante, el fosfato liberado del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo que proporciona un estímulo inicial a la formación de hueso al comenzar el proceso de nucleación y crecimiento de productos minerales.

La invención también se refiere a un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo como se ha definido anteriormente, que cuando se incuba en un medio similar a fluidos fisiológicos que contienen iones de calcio supone una reacción del grupo fosfato con esos iones de calcio para proporcionar un precipitado de fosfatos de calcio sobre la matriz de colágeno, esos fosfatos de calcio que tienen las características de los precursores de hidroxiapatita.

Tras su implantación en diversos animales, en particular en ratas y perros, el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de la invención ha demostrado una excelente capacidad de formación

de hueso nuevo con ninguno o muy pocos acontecimientos histopatológicos adversos (reacciones inflamatorias o a cuerpos extraños).

Esta capacidad de formación de hueso nuevo se encuentra en consonancia con las enseñanzas, en particular, de Chai YC et al., 2011, Tissue Engineering Part A, 17, 1083-97 "Probing the osteoinductive effect of calcium phosphate by using an *in vitro* biomimetic model". Estos autores en particular han demostrado que el fosfato de calcio dirige las células pluripotenciales mesenquimales hacia el linaje osteoblástico mejorando así presumiblemente la formación de hueso. Por otra parte, Sogo Y et al., 2007, 2, 1 16-23 enseña la coprecipitación de fosfato de calcio con colágeno en una solución supersaturada de fosfato de calcio y su efecto sobre células pluripotenciales mesenquimales, en concreto la potenciación de la diferenciación osteogénica.

Los presentes inventores de forma inesperada han descubierto lo siguiente:

Para estar en condiciones de desempeñar un papel en la promoción de formación de hueso, el grupo fosfato debe estar contenido en una cantidad suficiente, normalmente al menos el 0,7 % en peso/peso, preferentemente al menos el 1,0 % en peso/peso, del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo.

Cuando se libera en exceso en fluidos fisiológicos el grupo fosfato podía provocar una gran precipitación de fosfatos de calcio, dando lugar a una posible respuesta inflamatoria adversa. Dicha respuesta no se produce cuando el grupo fosfato no es superior al 5,6 % en peso/peso, preferentemente al 2,8 % en peso/peso del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo.

El material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de la invención así contiene del 0,7 al 5,6 % en peso/peso, preferentemente del 1,0 al 2,8 % en peso/peso de un grupo fosfato que es apto para reaccionar con los iones de calcio de fluidos fisiológicos para proporcionar un precursor de hidroxiapatita.

La invención también se refiere al uso del 0,7 al 5,6 % en peso/peso de un grupo fosfato apto para reaccionar con los iones de calcio de fluidos fisiológicos para proporcionar un precursor de hidroxiapatita, seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4 , para potenciar la capacidad de formación de hueso nuevo de un material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural, en el que esencialmente se elimina todo el material orgánico no colagenoso mientras que esencialmente se conservan la estructura ósea inorgánica porosa y la estructura colagenosa de hueso natural, con ninguno o muy pocos acontecimientos histopatológicos adversos (reacciones inflamatorias o a cuerpos extraños).

En ciertas realizaciones, el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo se reviste con glucosa y tampón de fosfato sódico.

En ciertas realizaciones, el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo se reviste con sorbitol y tampón de fosfato sódico.

En ciertas realizaciones, el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo además contiene uno o más agentes farmacéuticamente activos.

Ejemplos de agentes activos farmacéuticamente aceptables son taurolidina, viricidas, microbicidas, antibióticos, aminoácidos, péptidos, proteínas, vitaminas, cofactores para la síntesis de proteínas, hormonas, células vivas, incluyendo células pluripotenciales, enzimas, agentes antigénicos, agentes antitumorales, inmunosupresores y factores de crecimiento.

El material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado puede tener cualquier forma incluyendo, sin limitación, un bloque 10 (Fig. 3), un pasador (perno) 12 (Fig. 4), una placa 14 (Fig. 5), una llave o tira cónica 16 (denominada "chaveta" en el Reino Unido, Fig. 6), una barra 18 (Fig. 7), o un granulado óseo 20 (Fig. 8), y similares.

En una primera realización, la estructura es un bloque 10 como se muestra en la Fig. 3, en una segunda realización es una tira como se muestra en la Figura 6, y en una tercera realización es un granulado como se muestra en la Fig. 8.

La invención además se refiere al uso de un material de sustitución ósea tal como se describe en la presente memoria como implante de remodelación.

La invención también se refiere al uso del 0,05 al 1,5, preferentemente del 0,05 al 0,8, en particular del 0,05 al 0,5 % en peso/peso de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar para conferir propiedades hidrófilas a un material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural, en el que esencialmente se elimina todo el material orgánico no colagenoso mientras que esencialmente se conservan la estructura ósea inorgánica porosa y la estructura colagenosa de hueso natural.

Preparación del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo

El material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de la invención de origen natural se puede producir mediante un proceso que comprende:

- 5
- (a) suministrar un material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural mediante la extracción en primer lugar de lípidos con disolventes orgánicos, tratando así el material deslipidizado con una solución que contiene un agente caotrópico y realizar un lavado exhaustivo con agua,
 - 10 (b) empapar el material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural en una solución que contiene el 0,05-0,85 % en peso/peso de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar, proporcionando así hidrofilia al material de sustitución ósea parcialmente purificado, y 10-1000 mM de un grupo fosfato que es apto para reaccionar con los iones de calcio de fluidos fisiológicos para proporcionar un precursor de este grupo fosfato que es parte de un tampón de fosfato sódico,
 - 15 (c) criodesecar el material de sustitución ósea parcialmente purificado hidrófilo empapado, realizando así la deshidratación, y
 - (d) esterilizar el material de sustitución ósea crio-desecado parcialmente purificado hidrófilo.

Los disolventes orgánicos usados para la extracción de lípidos en la etapa (a) pueden incluir metanol, etanol, propanol, hexano, ciclohexano, acetona y/o tolueno.

Dicho agente caotrópico usado en la etapa (a) comprende, por ejemplo, urea, tiourea, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, clorhidrato de aminoguanidina, bicarbonato de aminoguanidina, carbonato de guanidina, fosfato de guanidina, o sus mezclas.

En una realización el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen natural se produce mediante un proceso que comprende las etapas de:

- (a) suministrar un material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural mediante la extracción en primer lugar de lípidos con disolventes orgánicos, tratando así el material deslipidizado con una solución que contiene un agente caotrópico y realizar un lavado exhaustivo con agua,
- (b) empapar el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado de origen natural en una solución que contiene el 0,05-0,85 % en peso/peso de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar, proporcionando así hidrofilia al material de sustitución ósea parcialmente purificado, y 10-1000 mM de un grupo fosfato seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , este grupo fosfato que es parte de un tampón de fosfato sódico,
- (c) criodesecar el material de sustitución ósea parcialmente purificado hidrófilo empapado, realizando así la deshidratación, y
- (d) esterilizar el material de sustitución ósea crio-desecado parcialmente purificado hidrófilo.

En una realización la solución usada en la etapa (b) contiene tampón de fosfato sódico 75-600 mM, en particular 100-200 mM, a pH 7,0.

El proceso anterior también puede comprender una etapa de deshidratación intermedia adicional realizada sobre el material de sustitución ósea deslipidizado de origen natural obtenido durante la etapa (a), o el material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural obtenido al final de la etapa (a), tal como para interrumpir la estructura del colágeno y provocar la alteración de la orientación de las fibras de colágeno.

Esa etapa de deshidratación intermedia normalmente se realiza mediante el secado al vacío a una temperatura por encima de 0 °C, por ejemplo, de 5 a 50 °C, en particular de 10 a 40 °C o mediante el soplado vigoroso de un gas inerte tal como nitrógeno a través del material. El crio-desecado no es apropiado aquí debido a que la fijación por congelación del tejido blando del hueso produce una estructura cerrada de hueso natural que permanece esencialmente idéntica sin ninguna interrupción importante de la estructura del colágeno.

Realizando micrografías de microscopía electrónica de barrido del material antes y después de esa etapa de deshidratación, se puede demostrar que, después de esa etapa, el material presenta una estructura más abierta, interrumpida e irregular de colágeno que antes, correspondiente a una alteración de la orientación de las fibras de colágeno. Esa interrupción de la estructura del colágeno es particularmente evidente cuando se realiza la etapa de deshidratación intermedia sobre el material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural obtenido al final de la etapa (a).

Preferentemente, la etapa de deshidratación intermedia adicional es una etapa de secado al vacío realizada a una temperatura por encima de 0 °C sobre el material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural obtenido al final de la etapa (a), tal como para interrumpir la estructura del colágeno y provocar la alteración de la orientación de las fibras de colágeno.

La invención además se refiere a un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado preparado mediante el proceso anterior.

Hidrofilia e integración ósea del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado

5 La integración ósea, es decir, la conexión física directa del material de implante al tejido hospedador vivo circundante puede incrementar enormemente el éxito de la reparación del hueso. La hidrofilia es un factor importante que influye en la integración del hueso en el caso de materiales de sustitución ósea de origen animal. Cuanto más hidrófilo es el material, mejor y más rápida es la conexión física del material de implante al tejido circundante. No
10 existe una forma aceptada de forma general para medir o cuantificar la hidrofilia e integración ósea. Una medición indirecta de la integración ósea es detectar la capacidad de succión de una solución isotónica del injerto.

15 La capacidad de succión de una solución isotónica de un material óseo parcialmente purificado deshidratado es la propiedad de ese material para absorber una solución isotónica en su estructura interna. Esta propiedad depende de la estructura del poro, la humectabilidad y la capilaridad del material óseo y es un buen indicador de la integración ósea, es decir, la conexión física directa del material de implante al tejido hospedador vivo circundante, que desempeña un papel importante en el éxito de la reparación del hueso.

20 Para medir la capacidad de succión de una solución isotónica de un bloque de material de sustitución ósea sólido, se usó el siguiente método: sobre una balanza granataria se puso una cantidad definida de una solución isotónica de PBS (tampón fosfato salino) en un plato. Se fijó un bloque de un material de sustitución ósea deshidratado de un peso definido en un dispositivo de sujeción de altura ajustable separado de la balanza. A continuación se ajustó la altura del dispositivo de manera que el bloque del material de sustitución ósea apenas tocara la superficie del líquido acuoso en el plato. La altura del dispositivo era fija de forma que la distancia a la superficie del líquido permaneciese
25 constante a lo largo de la medición. En el bloque del material de sustitución ósea hidrófilo, el líquido se absorbió y se detectó la captación de líquido con la balanza en función del tiempo.

30 La capacidad de succión de una solución isotónica de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado se define como la masa de solución isotónica absorbida. La capacidad de succión isotónica relativa se define como la capacidad de succión de una solución isotónica por unidad de masa del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado.

35 Sorprendentemente se ha comprobado que el revestimiento del material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado de origen natural con al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar, y con una sal fisiológicamente aceptable, de forma que contenga del 0,05 al 1,5 % en peso/peso de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar, mejora enormemente la capacidad de succión de una solución isotónica.

40 La capacidad de succión relativa de una solución isotónica de dichos materiales de sustitución ósea tratados es de al menos el 50 % en 5 minutos pero puede ser de al menos el 100 % en 5 minutos o incluso de al menos el 200 % en 5 minutos.

En ciertas realizaciones, se ha comprobado que se alcanza aproximadamente el 50 % de la captación de líquido total en menos de dos minutos aproximadamente o incluso en menos de un minuto aproximadamente.

45 En ciertas realizaciones, se ha comprobado que dicha capacidad beneficiosa de succión de una solución isotónica se puede conseguir revistiendo el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado de origen natural con una menor cantidad de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar, de forma que contenga del 0,05 al 0,8 % en peso/peso, o incluso del 0,05 al 0,5 % en peso/peso de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar.

- 50 Estos hallazgos se relacionan con ventajas fundamentales, en particular:
- la integración esencialmente inmediata del injerto con el tejido circundante;
 - 55 – no es necesario que el cirujano tenga que pretratar el material de sustitución ósea antes de su uso y por tanto se pueden reducir los riesgos de contaminación del material;
 - el sacárido o alcohol de azúcar, que es una sustancia no fisiológica diseñada para eliminarse por arrastre por los fluidos fisiológicos se mantiene al mínimo, por tanto el funcionamiento del cuerpo humano se altera mínimamente
60 y el material óseo hidrófilo implantado será tolerado óptimamente por el paciente;
 - mejores resultados de curación y más rápidos que en las técnicas anteriores.

65 Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin restringir su ámbito.

Ejemplo 1 Preparación de bloques parcialmente purificados deshidratados de hueso esponjoso de origen equino que contienen el 1,5 % en peso/peso de glucosa y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .

Se cortó hueso esponjoso de origen equino en bloques de $12 \times 12 \times 5$ mm.

Se realizaron las siguientes etapas sobre estos bloques: etapas de lavado selectivo con agua y/o un disolvente orgánico tal como acetona o un alcohol (por ejemplo, etanol), etapas de desactivación de virus usando hidróxido sódico y/o peróxido de hidrógeno, deslipidación con un disolvente orgánico tal como metanol, etanol, propanol, hexano, ciclohexano, acetona, o tolueno, y a continuación etapas de lavado con una solución que contiene una sal caotrópica tal como urea o clorhidrato de guanidina a una temperatura entre 4 °C y 35 °C. Los bloques resultantes se enjuagaron abundantemente con agua y por último se secaron al vacío.

La observación de estos bloques mediante microscopía electrónica de barrido mostraba que esencialmente se conserva la estructura nativa del colágeno. El análisis de estos bloques mediante diversas técnicas que incluyen SDS-PAGE 2D semicuantitativa mostraba la presencia de menos del 1 % de proteínas extraíbles aparte del colágeno.

A continuación los bloques se sumergieron en una solución del 0,86 % en peso/peso de glucosa que contiene tampón de fosfato sódico 200 mM a pH 7,0 (preparada disolviendo NaH_2PO_4 en agua desmineralizada y ajustando el pH con hidróxido sódico) a temperatura ambiente durante 3 horas, extrayéndolos de la solución acuosa con pinzas y a continuación criodesecando y esterilizando usando radiación gamma. Se demuestra que los bloques obtenidos contienen el 1,5 % en peso/peso aproximadamente de glucosa y el 1,87 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .

Ejemplo 2 Preparación de bloques parcialmente purificados deshidratados de hueso esponjoso de origen equino que contienen el 0,35 % en peso/peso de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .

Se cortó hueso esponjoso de origen equino en bloques de $10 \times 10 \times 5$ mm.

Se realizaron las siguientes etapas sobre estos bloques: etapas de lavado selectivo con agua y/o un disolvente orgánico tal como acetona o un alcohol (por ejemplo, etanol), etapas de desactivación de virus usando hidróxido sódico y/o peróxido de hidrógeno, deslipidación con un disolvente orgánico tal como metanol, etanol, propanol, hexano, ciclohexano, acetona, o tolueno, y a continuación etapas de lavado con una solución que contiene una sal caotrópica tal como urea o clorhidrato de guanidina a una temperatura entre 4 °C y 35 °C. Los bloques resultantes se enjuagaron abundantemente con agua y por último se secaron al vacío.

La observación de estos bloques mediante microscopía electrónica de barrido mostraba que esencialmente se conserva la estructura nativa del colágeno. El análisis de estos bloques mediante diversas técnicas que incluyen SDS-PAGE 2D semicuantitativa mostraba la presencia de menos del 1 % de proteínas extraíbles aparte del colágeno.

A continuación los bloques se sumergieron en una solución acuosa del 0,2 % en peso/peso de sorbitol que contiene tampón de fosfato sódico 150 mM a pH 7,0 (preparada disolviendo NaH_2PO_4 en agua desmineralizada y ajustando el pH con hidróxido sódico) a temperatura ambiente durante 2 horas, extrayéndolos de la solución acuosa con pinzas y a continuación criodesecando y esterilizando usando radiación gamma. Se demuestra que los bloques obtenidos contienen el 0,35 % en peso/peso aproximadamente de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .

Ejemplo 2 bis Preparación de bloques parcialmente purificados deshidratados "no plastificados" de hueso esponjoso de origen equino que contienen el 0,35 % en peso/peso de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .

Se cortó hueso esponjoso de origen equino en bloques de $10 \times 10 \times 5$ mm.

Se realizaron las siguientes etapas sobre estos bloques: etapas de lavado selectivo con agua y/o un disolvente orgánico tal como acetona o un alcohol (por ejemplo, etanol), etapas de desactivación de virus usando hidróxido sódico y/o peróxido de hidrógeno, deslipidación con un disolvente orgánico tal como metanol, etanol, propanol, hexano, ciclohexano, acetona, o tolueno, y a continuación etapas de lavado con una solución que contiene una sal caotrópica tal como urea o clorhidrato de guanidina a una temperatura entre 4 °C y 35 °C. Los bloques resultantes se enjuagaron abundantemente con agua y a continuación se sometieron a una etapa de secado al vacío a temperatura ambiente durante 240 minutos a una presión inferior a 20.000 Pa.

La observación de estos bloques mediante microscopía electrónica de barrido antes de la etapa de secado al vacío (secado por criodesecación) y después de esa etapa mostraba una diferencia sustancial en la estructura del colágeno: después de la etapa de secado al vacío la estructura del colágeno era más abierta, interrumpida e irregular, correspondiente a una alteración de la orientación de las fibras de colágeno.

Estos bloques por tanto son "no plastificados", es decir, no corresponden a la definición de "plastificados" de la patente de Estados Unidos n.º 6.293.970 y US2010/0030340 (véase página 3 anterior, líneas 10-139).

El análisis de los bloques obtenidos después de la etapa de secado al vacío mediante diversas técnicas que incluyen SDS-PAGE 2D semicuantitativa mostraba la presencia de menos del 1 % de proteínas extraíbles aparte del colágeno.

5 A continuación los bloques se sumergieron en una solución acuosa del 0,2 % en peso/peso de sorbitol que contiene tampón de fosfato sódico 150 mM a pH 7,0 (preparada disolviendo NaH_2PO_4 en agua desmineralizada y ajustando el pH con hidróxido sódico) a temperatura ambiente durante 2 horas, extrayéndolos de la solución acuosa con pinzas y a continuación criodesecando y esterilizando usando radiación gamma. Se demuestra que los bloques obtenidos contienen el 0,35 % en peso/peso aproximadamente de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .

10 Ejemplo 3 Medición de la capacidad de succión de una solución isotónica con respecto al tiempo para materiales óseos parcialmente purificados deshidratados de acuerdo con la invención

15 Para medir la capacidad de succión de una solución isotónica de un bloque de un material de sustitución ósea sólido, se usó el método siguiente:

20 Sobre una balanza granataria, se puso una cantidad definida de una solución isotónica de PBS en un plato. Se fijó un bloque de un material de sustitución ósea deshidratado de un peso definido en un dispositivo de sujeción de altura ajustable separado de la balanza. A continuación se ajustó la altura del dispositivo de manera que el bloque del material de sustitución ósea apenas tocara la superficie del líquido acuoso en el plato. La altura del dispositivo era fija de forma que la distancia a la superficie del líquido permaneciese constante a lo largo de la medición. En el bloque del material de sustitución ósea hidrófilo, el líquido se absorbió y se detectó la captación de líquido con la balanza en función del tiempo.

25 Se usó el método anterior para medir la capacidad de absorción de una solución isotónica de:

- 8 bloques diferentes (con una densidad entre 0,230 y 0,500 g/cm^3) de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen equino de acuerdo con la invención, que contiene el 0,35 % en peso/peso de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- preparado como en el Ejemplo 2.
- 30 – 3 bloques diferentes de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado de origen equino preparado como en el segundo párrafo del Ejemplo 2 (sin sorbitol o fosfato), y
- bloque disponible en el mercado de un material de sustitución bovino TUTOBONE® (Tutogen Medical GmbH).

35 Los resultados están representados en las Figuras 1A y 1B.

40 La Figura 1A muestra la capacidad de succión relativa de una solución isotónica (captación de líquido en mg) con respecto al tiempo para los bloques anteriores.

La Figura 1B muestra la capacidad de succión relativa de una solución isotónica (relación ponderal entre la captación de líquido y el bloque deshidratado, expresada en porcentaje) con respecto al tiempo para los bloques anteriores.

45 Como resulta evidente de la Figura 1A:

- la presencia del 0,35 % de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- incrementa drásticamente la capacidad de succión de una solución isotónica,
- 50 – se alcanza más del 50 % de la captación de líquido total en menos de 2 minutos, o incluso en menos de 1 minuto.

Como resulta evidente de la Figura 1B:

- 55 – la capacidad de succión relativa de una solución isotónica con 5 minutos es de al menos del 100 % para todos los bloques,
- pero puede ser de al menos el 150 % (5 bloques) o incluso de al menos el 200 % (un bloque). Los experimentos anteriores muestran la alta hidrofilia de los bloques de materiales óseos parcialmente purificados deshidratados de acuerdo con la invención que contienen el 0,35 % en peso/peso de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .

En una serie de experimentos similares se demostró que bloques de materiales óseos parcialmente purificados deshidratados de acuerdo con la invención que contienen el 0,05, 0,2, 0,46, 1,14 o 1,50 % en peso/peso de sorbitol

y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- tienen la misma alta hidrofilia (la capacidad de absorción relativa de una solución isotónica medida no era significativamente diferente para los diversos contenidos de sorbitol).

5 Ejemplo 4 Formación por reacción con iones de calcio presentes en un medio similar a fluidos fisiológicos de un precipitado que probablemente es un precursor de la hidroxiapatita sobre la superficie de materiales óseos parcialmente purificados deshidratados de acuerdo con la invención.

10 – Un bloque de 150 mg aproximadamente de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen equino de acuerdo con la invención, que contiene el 0,35 % en peso/peso de sorbitol y el 1,4 % en peso/peso de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- preparado como se describe en el Ejemplo 2, y

– 3 ml de tampón de fosfato sódico 150 mM (que contiene la misma cantidad de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- que el bloque anterior) sin ningún bloque,

15 se incubaron durante 72 horas a 37 °C en 3 ml de DMEM (Medio de Eagle modificado de Dulbecco) que contiene el 10 % de FCS (suero fetal bovino) (un medio similar a fluidos fisiológicos que contiene una concentración de iones de calcio de 65 mg/l aproximadamente).

20 El medio obtenido incubando el tampón de fosfato sódico se volvió turbio y permaneció así durante todo el periodo de incubación mientras que el medio obtenido por incubación de cada uno de los bloques anteriores permaneció claro durante todo el periodo de incubación.

25 El bloque anterior se extrajo del medio de incubación, se fijó con PFA al 4 % (paraformaldehído), se secó y se analizó mediante SEM (microscopía electrónica de barrido).

Véase Figura 2, que representa una micrografía de ese bloque: El precipitado está representado en blanco sobre la superficie del material, con las fibrillas de colágeno que son visibles en forma de red grisácea debajo del precipitado.

30 Para caracterizar adicionalmente la reacción del bloque con los iones de calcio presentes en el medio, se midió la concentración de Ca del medio antes y después de 24 horas de incubación con el bloque. La cantidad medida de iones de calcio en solución después de 24 horas de incubación era muy inferior (aproximadamente 2,0 mg/ml) que la cantidad inicial de iones de calcio (aproximadamente 50 mg/ml), lo que demuestra la reacción de los iones de calcio con los grupos fosfato.

35 Puesto que no era posible eliminar el precipitado de estos bloques para analizar su composición, se lavó el precipitado formado en el medio turbio en condiciones similares incubando 3 ml de tampón de fosfato sódico 150 mM sin ningún bloque, se secó y se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDX). Se comprobó que el precipitado contenía calcio, fosfato y oxígeno e incluía dos tipos de fosfatos de calcio de morfologías diferentes, una cristalina (lamelas de bordes afilados) con una relación molar de calcio:fosfato 1:1 y la otra criptocristalina o amorfa (aglomerados de partículas finas) con una relación de 4:3. Ambos tipos estructurales representan una relación molar Ca:P distinta a la hidroxiapatita, lo que indica que ambas fases se pueden describir como precursores de la hidroxiapatita. De hecho, todas las sales basadas en ortofosfato de calcio se deben transformar en hidroxiapatita, la forma termodinámicamente más estable de todas las sales de ortofosfato de calcio en medio acuoso a pH 7 aproximadamente a una temperatura de 37 °C aproximadamente, las condiciones normales encontradas en el cuerpo humano.

50 Estos experimentos muestran que en el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con la invención, que contiene una cantidad sustancialmente inferior de agente humectante que los materiales de sustitución óseos hidrófilos conocidos de la técnica anterior, los grupos fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- reaccionan con los iones de calcio de los fluidos corporales para formar un precipitado sobre la superficie del biomaterial, este precipitado que tiene las características de un precursor de la hidroxiapatita.

55 Los experimentos *in vitro* anteriores proporcionan una fuerte indicación de que *in vivo*, como en sistemas naturales, tendrá lugar la nucleación y el crecimiento de los productos minerales óseos sobre la matriz de colágeno, con los grupos fosfato liberados en los fluidos fisiológicos que desempeñan un papel en dichas reacciones.

REIVINDICACIONES

1. Un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de origen natural, en el que esencialmente se elimina todo el material orgánico no colagenoso mientras que esencialmente se conservan la estructura ósea inorgánica porosa y la estructura colagenosa de hueso natural, caracterizado por que el material de sustitución ósea contiene del 0,05 al 1,5 % en peso/peso de al menos un sacárido o un alcohol de azúcar, y del 0,7 al 5,6 % en peso/peso de un grupo fosfato seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , este grupo fosfato que es parte de una sal fisiológicamente aceptable que es tampón de fosfato sódico.
2. Un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene del 1,0 al 2,8 % en peso/peso de un grupo fosfato seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- .
3. Un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el alcohol de azúcar es sorbitol.
4. Un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sacárido es glucosa.
5. Un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que es de origen bovino, porcino o equino.
6. Un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que además contiene un agente farmacéuticamente activo.
7. Un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que está en forma de bloque.
8. Un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que cuando se incuba en un medio similar a fluidos fisiológicos que contienen iones de calcio implica una reacción del grupo fosfato con esos iones de calcio para proporcionar un precipitado de fosfatos de calcio sobre la matriz de colágeno, estos fosfatos de calcio que tienen las características de precursores de hidroxiapatita.
9. Un proceso para la preparación de un material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado hidrófilo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende las etapas de:
- suministrar un material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural mediante la extracción en primer lugar de lípidos con disolventes orgánicos, tratando así el material deslipidizado con una solución que contiene un agente caotrópico y realizar un lavado exhaustivo con agua,
 - empapar el material de sustitución ósea parcialmente purificado deshidratado de origen natural en una solución que contiene el 0,05-0,85 % en peso/peso de al menos uno de un sacárido o un alcohol de azúcar, proporcionando así hidrofilia al material de sustitución ósea parcialmente purificado, y 10-1000 mM de un grupo fosfato seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , este grupo fosfato que es parte de un tampón de fosfato sódico,
 - criodesecar el material de sustitución ósea parcialmente purificado hidrófilo empapado, realizando así la deshidratación, y
 - esterilizar el material de sustitución ósea crio-desechado parcialmente purificado hidrófilo.
10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la solución usada en la etapa (b) contiene tampón de fosfato sódico 75-600 mM, en particular 100-200 mM, a pH 7,0.
11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, que comprende una etapa de deshidratación intermedia adicional realizada sobre el material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural obtenido al final de la etapa (a) tal como para interrumpir la estructura del colágeno y provocar la alteración de la orientación de las fibras de colágeno.
12. Uso del 0,7 al 5,6 % en peso/peso de un grupo fosfato apto para reaccionar con los iones de calcio de fluidos fisiológicos para proporcionar un precursor de la hidroxiapatita seleccionado del grupo constituido por fosfato HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- , este grupo fosfato que es parte de un tampón de fosfato sódico, para mejorar la capacidad de formación de hueso nuevo y un material de sustitución ósea parcialmente purificado de origen natural a partir del cual esencialmente se elimina todo el material orgánico no colagenoso mientras que esencialmente se conservan la estructura ósea inorgánica porosa y la estructura colagenosa de hueso natural, que contiene del 0,05 al 1,5 % en peso/peso de al menos un sacárido o un alcohol de azúcar.

Fig. 1A

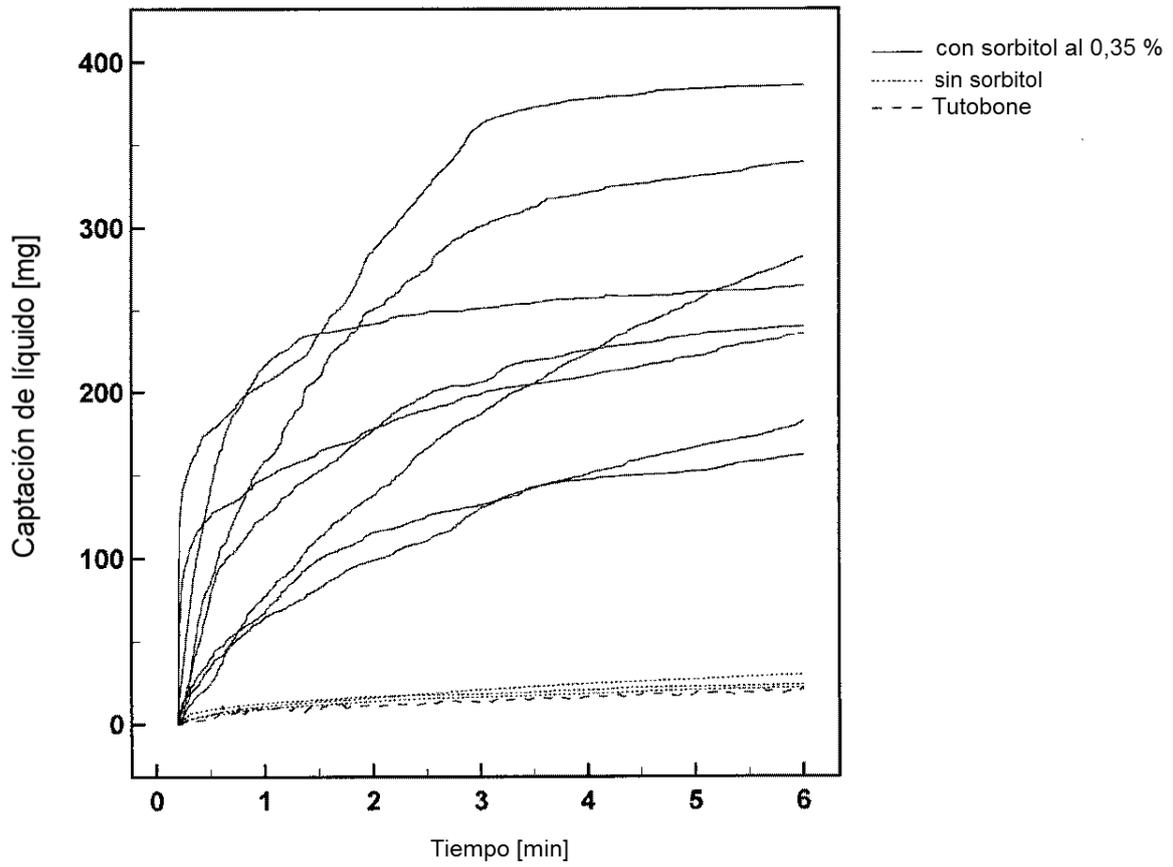


Fig.1B

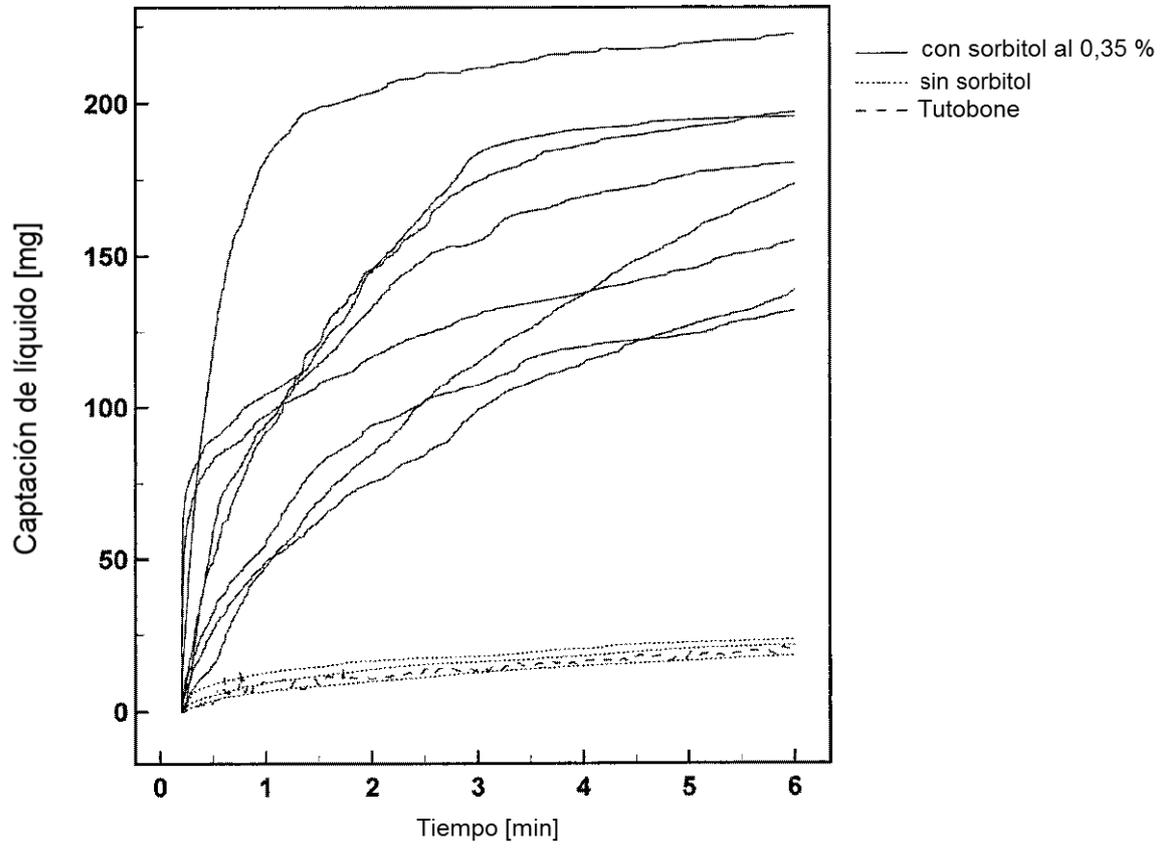
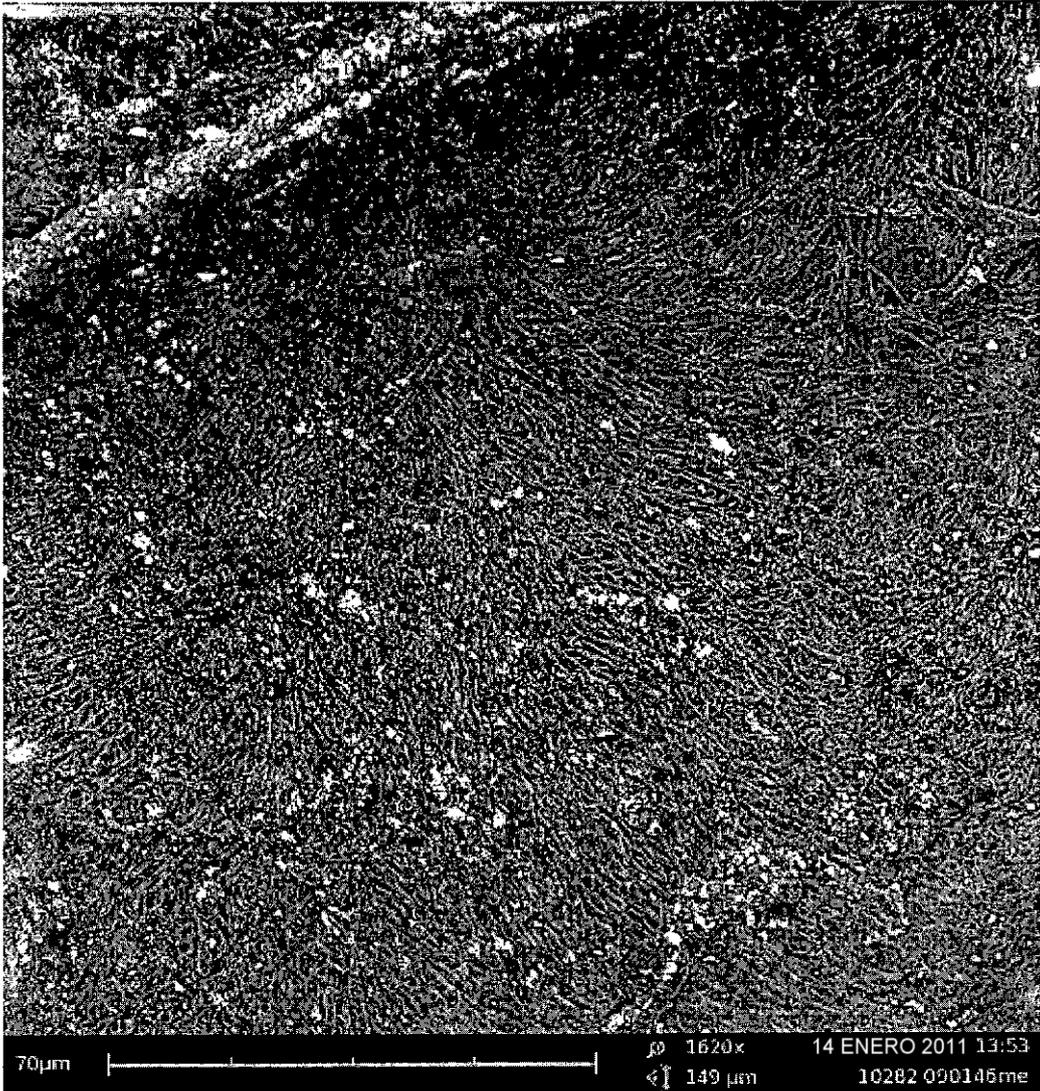


Fig 2



Figs. 3-8

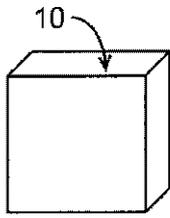


Figura 3

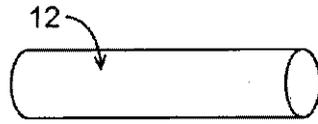


Figura 4

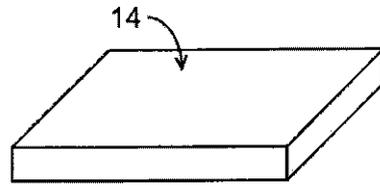


Figura 5

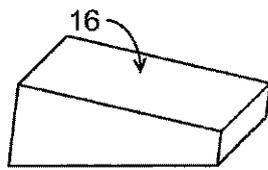


Figura 6

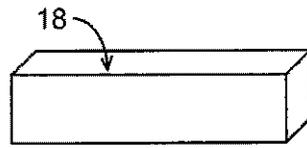


Figura 7



Figura 8