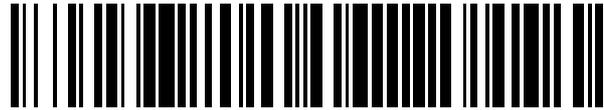


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 467**

51 Int. Cl.:

A61L 27/34 (2006.01)

C08L 89/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012** **E 12813670 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015** **EP 2793963**

54 Título: **Matriz continua con partículas osteoconductoras dispersadas en la misma, procedimiento de formación, y su uso para regenerar el hueso con la misma**

30 Prioridad:

23.12.2011 US 201161579820 P

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

12.02.2016

73 Titular/es:

PIONEER SURGICAL TECHNOLOGY, INC.

(100.0%)

**375 River Park Circle
Marquette, MI 49855, US**

72 Inventor/es:

LAMBERTI, FRANCIS VINCENT;

HILL, RONALD STEWART;

MACMILLAN, ADAM;

AHN, EDWARD;

SCHLOSSBERG, BRIAN;

CAPISTRON, STEPHEN y

LLOYD, WILLIAM H.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 559 467 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

Matriz continua con partículas osteoconductoras dispersadas en la misma, procedimiento de formación, y su uso para regenerar el hueso con la misma

Campo de la divulgación

5 La presente divulgación se refiere a una matriz continua formada por un primer polímero biocompatible reticulado con un segundo polímero biocompatible, teniendo la matriz, dispersadas en la misma, partículas de un material poroso, osteoconductor, teniendo al menos una parte de los poros de las partículas adsorbido en los mismos, un material biocompatible. La divulgación se refiere además a procedimientos para preparar dichas matrices y a métodos de uso de dichas matrices.

10 Antecedentes de la divulgación

El crecimiento exitoso de hueso en vacíos o huecos, bien creados de forma quirúrgica o que surgen de enfermedad o lesión, es un reto continuado. Se han usado muchas técnicas en un intento de potenciar el crecimiento óseo, y están disponibles en el mercado varios materiales de relleno óseo. No obstante, sigue existiendo la necesidad de composiciones de relleno óseo en una forma que posibilite un buen periodo de validez, sea fácil de usar, y sea eficaz en toda una diversidad de usos.

15 En dos publicaciones por Cheny col., se han descrito nuevos armazones de hidrogel de dextrano glicidil metacrilado (Dex-GMA)/gelatina que contienen microesferas cargadas con proteínas morfogenéticas del hueso, incluyendo su uso para regeneración periodontal (Cheny col. en *Journal of Controlled Release* 2007 (118) 65-77, y *Journal of Controlled Release* 2007 (121)(81-90).

20 El documento WO 2003/072155 A1 desvela una matriz de hidrogel bioactivo reticulada que comprende un primer componente de alto peso molecular y un segundo componente de alto peso molecular reticulado covalentemente con el primer componente, en la que ambos componentes se seleccionan del grupo que consiste en poliglucanos y polipéptidos. La matriz comprende además un agente potenciador seleccionado de aminoácidos polares, análogos de aminoácidos, derivados de aminoácidos, colágeno intacto, quelantes de cationes divalentes y combinaciones de los mismos.

25 Breve resumen de la divulgación

La presente divulgación proporciona una composición de relleno de hueso reabsorbible, osteoconductor, formada por una matriz continua de un hidrogel reticulado con partículas de un material poroso, osteoconductor dispersado en el mismo. La composición puede proporcionarse en un estado deshidratado y puede moldearse en formas deseables. Además, la composición deshidratada puede cortarse o moldearse de otro modo según se requiera en el momento del uso. Cuando se rehidrata, la matriz puede adaptarse a la anatomía del sitio de tratamiento.

30 La composición puede usarse para regenerar hueso en una diversidad de aplicaciones y puede usarse particularmente para rellenar defectos óseos. Dichos defectos en el hueso pueden ser defectos óseos creados quirúrgicamente o pueden ser defectos creados a partir de lesión traumática al hueso o de enfermedad. La composición puede empaquetarse en vacíos o huecos óseos y puede hidratarse en el momento de uso (por ejemplo, rehidratarse a partir de una forma deshidratada en el momento de uso) o puede hidratarse *in vivo*. La composición se reabsorbe beneficiosamente y se reemplaza por el crecimiento de nuevo hueso durante el proceso de curación. En realizaciones específicas, la composición puede ser particularmente útil en aplicaciones vertebrales, tales como procedimientos de fusión vertebral posterolateral y para empaquetamiento en cajetines intervertebrales dentro de la columna vertebral. El material deshidratado puede rehidratarse usando una diversidad de materiales, incluyendo agua estéril, solución de tampón y fluidos corporales naturales, incluyendo aspirados de la médula ósea. Si se desea, la composición puede combinarse con materiales adicionales, tales como hueso autógeno y materiales osteoinductores.

45 En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona por lo tanto una composición que comprende: una matriz continua formada por un polipéptido (es decir, un "primer polímero") reticulado con un segundo polímero que comprende un polisacárido; y partículas de un material poroso, osteoconductor, dispersado en la matriz continua; en la que los poros del material osteoconductor tienen un material biocompatible adsorbido en los mismos. En realizaciones específicas, la composición se deshidrata y puede rehidratarse para su uso como se describe en el presente documento. La presencia del material biocompatible en los poros de las partículas osteoconductoras puede ser particularmente beneficiosa para facilitar la formación de una composición final que sea suficiente para el uso pretendido. Más específicamente, la presencia del material biocompatible en los poros de las partículas osteoconductoras puede evitar competición no deseada durante la reticulación del polipéptido y el segundo polímero y asegurar que estén disponibles suficientes sitios de unión en el segundo polímero para reticulación completa con el polipéptido para formar un armazón útil. En ausencia del material biocompatible en los poros de las partículas osteoconductoras, las partículas pueden unirse con una parte significativa de los sitios disponibles en el segundo polímero para inhibir la formación de armazón de matriz apropiado, y el material resultante puede ser inadecuado para su uso y ser de hecho citotóxico en ensayos celulares *in vitro*.

Como se ha observado anteriormente, el segundo polímero usado en la composición comprende un polisacárido. En particular, el polisacárido puede ser dextrano o dextrano oxidado. En realizaciones específicas, el polipéptido puede comprender gelatina.

5 Puede usarse una diversidad de materiales biocompatibles para adsorber en los poros de las partículas osteoconductoras. En ciertas realizaciones, el material biocompatible puede comprender un polipéptido. Si se desea, el polipéptido usado como el material biocompatible puede ser el mismo polipéptido que se reticula con el segundo polímero. En otras realizaciones, el polipéptido usado como el material biocompatible puede ser un material que es diferente del polipéptido que se reticula con el segundo polímero.

10 El material poroso, osteoconductor puede seleccionarse de una amplia diversidad de materiales como se describe en el presente documento. En realizaciones específicas, el material poroso, osteoconductor puede ser hidroxiapatita. Las partículas del material poroso, osteoconductor, pueden caracterizarse en relación con ciertas dimensiones. Por ejemplo, las partículas porosas osteoconductoras pueden tener un diámetro promedio de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 2000 μm . Las partículas del material poroso, osteoconductor, pueden tener un diámetro de poro medio (volumen) de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 450 μm . Las partículas del material poroso, osteoconductor, pueden tener un diámetro de poro medio (área) de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 60 μm . Las partículas del material poroso, osteoconductor, pueden tener una porosidad de aproximadamente 35 % o mayor. Las partículas del material poroso, osteoconductor, pueden tener un área de superficie de aproximadamente 1 m^2/g o mayor. Las partículas del material poroso, osteoconductor, pueden ser amorfas con poros de interconexión. Las partículas del material poroso, osteoconductor y la matriz continua pueden combinarse en relaciones específicas. Por ejemplo, las partículas del material poroso, osteoconductor y la matriz continua pueden estar presentes en una relación de peso seco de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 50:50. La composición puede deshidratarse, si se desea, y la composición deshidratada puede proporcionarse en cualquier forma deseable y tener diversas dimensiones. La composición deshidratada permite además beneficiosamente diversos usos del material porque el especialista clínico puede manipular láminas o bloques preformados (u otras formas) de la composición para formar un tamaño deseado de material moldeado para los inventores en un procedimiento de relleno de huesos.

Además de lo anterior, las composiciones de la presente divulgación pueden incluir uno o más componentes adicionales. En algunas realizaciones, la composición puede comprender además un reactivo de armazón. Por ejemplo, el reactivo de armazón puede seleccionarse del grupo que consiste en aminoácidos polares, quelantes de cationes divalentes y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, la composición puede comprender además un tampón. En realizaciones adicionales, la composición puede comprender además un material osteoinductor. Por ejemplo, el material osteoinductor puede comprender aspirados de médula ósea.

En realizaciones específicas, la composición puede comprender una matriz continua formada por gelatina reticulada con dextrano; y partículas de un material poroso, de fosfato cálcico dispersado en la matriz continua; en la que los poros del material de fosfato cálcico tienen un contenido de gelatina adsorbido en los mismos; y en la que la composición está deshidratada.

La divulgación proporciona además métodos para preparar una composición de relleno de hueso. En ciertas realizaciones, el método comprende: combinar partículas de un material poroso, osteoconductor, con una solución de un polipéptido para formar una pasta; y añadir a la pasta un segundo polímero en condiciones tales que el polipéptido se reticule con el segundo polímero para formar una matriz continua que tenga las partículas del material osteoconductor dispersadas en la misma. Preferentemente, antes de dicha etapa de adición, al menos una parte de los poros en las partículas del material osteoconductor tienen un material biocompatible adsorbido en los mismos. El material biocompatible puede ser como se describe de otro modo en el presente documento. Los materiales usados en la preparación de la composición pueden ser como se describe en el presente documento.

45 En algunas realizaciones, el segundo polímero puede solubilizarse al menos parcialmente antes de añadirse al polipéptido. El procedimiento también puede comprender añadir un reactivo de armazón a la composición, añadir un tampón a la composición, añadir un agente de ajuste de osmolalidad a la composición y/o añadir un material osteoinductor a la composición. Si se desea, dichos aditivos pueden añadirse a la solución polipeptídica antes, durante o después de la combinación con las partículas osteoconductoras o pueden añadirse a una solución del segundo polímero. Las partículas del material poroso, osteoconductor, el polipéptido, y el segundo polímero pueden combinarse de modo que las partículas y la matriz continua estén presentes en una relación en peso seco de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 50:50. La composición puede además deshidratarse. Opcionalmente, los métodos pueden comprender moldear la composición deshidratada, por ejemplo, en partículas, tiras, tapones, cilindros, y similares.

55 La mezcla de los materiales usados para formar la composición puede llevarse a cabo a una temperatura elevada por encima de la ambiental, tal como aproximadamente 30 $^{\circ}\text{C}$ o mayor, y puede llevarse a cabo durante un tiempo definido. Se lleva a cabo deshidratación de la composición preferentemente para formar una composición que tenga un contenido de humedad residual, una porosidad promedio, y una mediana del diámetro de poro como se describe en otra parte en el presente documento.

La divulgación proporciona beneficiosamente procedimientos para promover el crecimiento de tejido conectivo, particularmente hueso, mediante el uso de la composición descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones, la divulgación comprende por lo tanto procedimientos para regenerar hueso. Por ejemplo, dicho procedimiento puede comprender aplicar a un vacío óseo una composición que comprende una matriz continua formada por un polipéptido reticulado con un segundo polímero y partículas de un material poroso, osteoconductor, dispersado en la matriz continua. Además, los poros del material osteoconductor pueden tener un material biocompatible adsorbido en los mismos. Además, después de la aplicación, la composición está preferentemente en una forma hidratada. En ciertas realizaciones, la composición puede estar en un estado deshidratado, y el procedimiento puede comprender hidratar al menos parcialmente la composición antes de aplicar la composición. En particular, la hidratación puede comprender combinar aspirados de médula ósea con la composición deshidratada. Más específicamente, la composición puede hidratarse parcial o completamente antes de la administración o puede hidratarse parcial o completamente después de que el material deshidratado se aplique al vacío óseo. Dichos procedimientos de tratamiento pueden aplicarse beneficiosamente a cualquier área del cuerpo donde se desee crecimiento óseo y, más particularmente, a tratamientos vertebrales.

En realizaciones adicionales, la presente divulgación proporciona diversos artículos de fabricación. Por ejemplo, la divulgación puede referirse a un kit que comprende uno o más recipientes que contienen una composición que comprende una matriz continua formada por un polipéptido reticulado con un segundo polímero y partículas de un material poroso, osteoconductor dispersadas en la matriz continua. Preferentemente, los poros del material osteoconductor pueden tener un material biocompatible adsorbido en los mismos. Dichos kits pueden comprender además un conjunto de instrucciones dirigido a un proveedor de cuidados sanitarios que describe etapas para administrar la composición a un vacío óseo en una cantidad eficaz para regenerar hueso en el vacío. La composición en el kit particularmente puede estar en una forma deshidratada, y el conjunto de instrucciones puede describir además etapas para la rehidratación de la composición. Por ejemplo, el conjunto de instrucciones puede describir combinar la composición con aspirados de médula ósea. Si se desea, el kit puede incluir además herramientas útiles para moldear la composición deshidratada y/o la composición hidratada. De forma similar, el kit puede incluir además fluidos útiles en la rehidratación de la composición, tal como una solución de tampón.

Descripción detallada de la divulgación

La presente divulgación se describirá ahora más completamente en lo sucesivo en el presente documento con referencia a realizaciones ejemplares de la misma. Estas realizaciones ejemplares se describen de modo que la presente divulgación sea exhaustiva y completa, y transmitirá completamente el alcance de la divulgación a los expertos en la materia. De hecho, la divulgación puede realizarse de muchas formas diferentes y no debería interpretarse que esté limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento; en su lugar, estas realizaciones se proporcionan para que la presente divulgación satisfaga los requisitos legales aplicables. Como se usa en la memoria descriptiva, y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “el”, incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa.

La presente divulgación proporciona composiciones que son particularmente útiles como rellenos de vacío óseo. No se pretende, sin embargo, que la composición se limite a dicho uso. En su lugar, se pretende que la divulgación abarque una diversidad de usos que pueden preverse con el conocimiento de la presente divulgación.

La presente composición comprende en general, como un componente de la misma, partículas de un material poroso, osteoconductor. Preferentemente, dichas partículas se dispersan en una matriz continua, como se describe adicionalmente posteriormente. El material osteoconductor puede comprender cualquier material que facilite el crecimiento interno de hueso en el área ocupada por el material. En algunas realizaciones, el material osteoconductor puede comprender un material que facilite la incursión de vasos sanguíneos y nueva formación de hueso en una estructura en enrejado pasiva definida. Más particularmente, el material osteoconductor puede ser un material de fosfato cálcico, tal como fosfato monocálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatita, hidroxiapatita coralina e hidratos de los mismos (por ejemplo, fosfato monocálcico monohidrato y fosfato dicálcico dihidrato). Pueden usarse particularmente materiales de fosfato cálcico bifásico. Por ejemplo, pueden usarse combinaciones de hidroxiapatita y fosfato tricálcico en relaciones de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 10:90, de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 50:50, o de aproximadamente 70:30 a aproximadamente 60:40.

Como ejemplos no limitantes, adicionales, pueden usarse los siguientes materiales osteoconductores: sulfato cálcico, aluminato cálcico, alúmina, circonita, silicatos de aluminio, fumarato de polipropileno, vidrio bioactivo, titanio poroso, aleación de níquel-titanio poroso, tántalo poroso, perlas de cobalto sinterizado-cromo, hueso autólogo, hueso alogénico, hueso xenogénico, coralina, y derivados o combinaciones de los mismos, u otros materiales compuestos producidos de forma biológica que contienen elementos estructurales de hidroxiapatita o calcio.

Cuando se usan materiales de fosfato cálcico, puede ser beneficioso proporcionar los materiales con una relación de calcio frente a fosfato definida. Preferentemente, la relación de calcio frente a fosfato puede ser de aproximadamente 1 o más pero menos de aproximadamente 5. En realizaciones específicas, por ejemplo, la relación de calcio frente a fosfato puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5, de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 2,3, o de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 2,1.

El material osteoconductor puede caracterizarse particularmente en relación con el tamaño de partícula del material. En algunas realizaciones, el diámetro de partícula promedio puede ser de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 3000 μm , de aproximadamente 2 μm a aproximadamente 2000 μm , de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 1000 μm , de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 850 μm , o de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 500 μm . Más particularmente, la distribución de tamaños de partículas puede ser tal que aproximadamente el 80 % de las partículas tengan un diámetro de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 1000 μm , de aproximadamente 200 μm a aproximadamente 850 μm , o de aproximadamente 250 μm a aproximadamente 750 μm .

El material osteoconductor puede caracterizarse adicionalmente en relación con la porosidad y/o el área de superficie de las partículas. Por ejemplo, las partículas pueden tener un diámetro de poro medio (volumen) de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 450 μm , de aproximadamente 150 μm a aproximadamente 400 μm , o de aproximadamente 200 μm a aproximadamente 300 μm , y las partículas pueden tener un diámetro de poro medio (área) de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 60 μm , de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 55 μm , o de aproximadamente 30 μm a aproximadamente 50 μm . El diámetro de poro promedio (calculado como $4 \times \text{volumen} / \text{área}$) puede ser de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 150 μm , de aproximadamente 60 μm a aproximadamente 145 μm , o de aproximadamente 70 μm a aproximadamente 120 μm . Las partículas también pueden caracterizarse en relación con presencia de macroporos (por ejemplo, poros que tienen un tamaño de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 3000 μm o de aproximadamente 200 μm a aproximadamente 2000 μm), microporos (por ejemplo, poros que tienen un tamaño de aproximadamente 1 μm a un tamaño menor de aproximadamente 100 μm o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 90 μm), y nanoporos (por ejemplo, poros que tienen un tamaño de aproximadamente 0,01 μm hasta un tamaño menor de aproximadamente 1 μm o de aproximadamente 0,05 μm a aproximadamente 0,9 μm). Las partículas pueden tener específicamente una porosidad de aproximadamente 35 % o mayor o, más particularmente, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 70 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 65 %, o de aproximadamente 45 % a aproximadamente 60 %. El área de superficie de partícula puede ser preferentemente de aproximadamente 1 m^2/g o mayor, aproximadamente 10 m^2/g o mayor, aproximadamente 30 m^2/g o mayor, o aproximadamente 50 m^2/g o mayor. Más particularmente, el área de superficie de partícula puede ser de aproximadamente 20 m^2/g a aproximadamente 120 m^2/g , de aproximadamente 40 m^2/g a aproximadamente 110 m^2/g , o de aproximadamente 50 m^2/g a aproximadamente 100 m^2/g . En realizaciones específicas, las partículas pueden comprender materiales tales que las partículas sean amorfas con poros de interconexión de tamaños y porosidad como se ha descrito anteriormente.

Las partículas porosas osteoconductoras pueden caracterizarse en relación con la microporosidad extensiva, microporosidad y/o nanoporosidad del material que puede desempeñar un papel clave en la adsorción de otros materiales de la composición, como se analiza adicionalmente en el presente documento. Como se ha observado anteriormente, cada partícula puede caracterizarse en relación con su macroporosidad así como su microporosidad y nanoporosidad, que pueden ser más extensivas. Se cree que la porosidad interconectada puede conducir particularmente la adsorción, y esto puede verse, por ejemplo, en realizaciones en las que las partículas tienen una red interconectada de poros individuales de un tamaño que es de aproximadamente 50 μm o menos, aproximadamente 25 μm o menos o aproximadamente 10 μm o menos.

Aunque los materiales osteoconductores usados en la presente divulgación pueden analizarse con respecto a ser partículas, los materiales no deberían verse como necesariamente limitados a una forma específica. En su lugar, se entiende que el término partícula transmite la naturaleza del material como proporcionada como una pluralidad de miembros pequeños, discretos. Por ejemplo, pueden usarse miembros en forma sustancialmente de varilla, y dichos miembros también pueden comprimirse si se desea.

Como se ha observado anteriormente, las partículas porosas, osteoconductoras, usadas en la presente composición pueden dispersarse o distribuirse de otro modo a lo largo de una matriz continua que está formada por un polipéptido reticulado con un segundo polímero. Los materiales reticulados pueden formar una matriz de hidrogel que se estabilizada o es estable porque el hidrogel puede caracterizarse como hinchable en agua, poco soluble y/o un material sólido o semisólido a temperatura fisiológica (es decir, aproximadamente 37 $^{\circ}\text{C}$), y en fluidos fisiológicos (por ejemplo, fluidos corporales acuosos que tienen un pH fisiológico de aproximadamente 7,4). Dicha matriz de hidrogel puede permanecer beneficiosamente presente en un hospedador durante un tiempo suficiente para conseguir una respuesta pretendida.

El polipéptido usado en la formación de la matriz reticulada puede comprender cualquier polipéptido producido de forma sintética o derivado de tejido, tal como colágenos o gelatinas derivadas de colágeno. En realizaciones específicas, la gelatina derivada de colágeno puede ser un polipéptido preferido. Las realizaciones adicionales, sin embargo, pueden comprender otros componentes de tipo gelatina caracterizados por una cadena principal comprendida por secuencias de aminoácidos que tienen grupos polares que son capaces de interactuar con otras moléculas, particularmente para formar enlaces covalentes. Por ejemplo, podría usarse queratina, decorina, agregano, glucoproteínas (incluyendo proteoglicanos), y similares para producir el componente polipeptídico. En una realización, el componente polipeptídico puede ser gelatina porcina de colágeno parcialmente hidrolizado derivado de tejido cutáneo. También podrían usarse polipéptidos derivados de otros tipos de tejido. Los ejemplos

incluyen, pero sin limitación, extractos tisulares de arterias, cuerdas vocales, pleura, tráquea, bronquios, septos alveolares pulmonares, ligamentos, cartílago auricular o fascia abdominal; la red reticular del hígado; la membrana basal del riñón; o el neurilema, aracnoides, duramadre o piamadre del sistema nervioso.

5 Se describen más materiales adicionales que pueden ser útiles como un material polipeptídico de acuerdo con la divulgación en la Patente de Estados Unidos N° 6.303.765, Patente de Estados Unidos N° 6.284.284, Patente de Estados Unidos N° 6.264.992 y Patente de Estados Unidos N° 4.829.000. El polipéptido puede tener específicamente un peso molecular de aproximadamente 3000 a aproximadamente 3.000.000 Da, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 750.000 Da o de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 300.000 Da.

10 El polipéptido preferentemente puede estar presente a una concentración de aproximadamente 25 mg/g o mayor. En realizaciones específicas, el polipéptido puede estar presente a una concentración de aproximadamente 25 mg/g a aproximadamente 600 mg/g, de aproximadamente 30 mg/g a aproximadamente 500 mg/g o de aproximadamente 40 mg/g a aproximadamente 400 mg/g en peso seco.

15 El componente polipeptídico de la matriz puede denominarse el primer polímero usado en la composición. Preferentemente, la composición incluye un segundo polímero que incluye sitios de unión para reticular con el polipéptido. Dichos sitios de unión pueden ser inherentes al segundo polímero, pueden formarse por pretratamiento del segundo polímero para convertir grupos no funcionales en sitios de unión (por ejemplo, oxidando el segundo polímero), o pueden estar presentes como grupos añadidos al segundo polímero para formar un polímero funcionalizado. El segundo polímero usado en la formación de la matriz reticulada puede abarcar por lo tanto una
20 amplia serie de materiales.

El segundo polímero comprende un polisacárido y que puede comprender cualquier polisacárido que consiste además en aproximadamente 10 restos monosacáridos unidos entre sí por enlaces glucosídicos (incluyendo polisacáridos formados por los mismos restos monosacáridos o diversos restos monosacáridos o derivados de
25 restos monosacáridos). En realizaciones específicas, el dextrano (o un derivado del mismo) puede ser un polisacárido particularmente preferido. En realizaciones adicionales, los polisacáridos útiles de acuerdo con la divulgación pueden incluir heparina, heparán, ácido hialurónico, alginato, agarosa, carragenina, amilopectina, amilosa, glucógeno, almidón, celulosa, quitina, quitosano y diversos polisacáridos sulfatados tales como heparán sulfato, condroitín sulfato, dextran sulfato, dermatán sulfato y queratán sulfato. Como se analiza adicionalmente posteriormente, pueden ser particularmente útiles derivados de los polisacáridos, tales como, por ejemplo, dextrano
30 oxidado. Los polisacáridos pueden tener un peso molecular de aproximadamente 2000 a aproximadamente 8.000.000 Da, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2.000.000, o de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 1.000.000 Da.

A no ser que se indique de otro modo, el peso molecular se expresa en el presente documento como el peso molecular promedio en número (M_n), que puede definirse por la siguiente fórmula:

$$35 \quad \frac{\sum NiMi}{\sum Ni},$$

en la que N_i es el número de moléculas poliméricas (o el número de moles de esas moléculas) que tienen un peso molecular M_i .

40 El segundo polímero preferentemente puede estar presente en una concentración de aproximadamente 10 mg/g o mayor. En realizaciones específicas, el segundo polímero puede estar presente a una concentración de aproximadamente 10 mg/g a aproximadamente 500 mg/g, de aproximadamente 15 mg/g a aproximadamente 400 mg/g o de aproximadamente 20 mg/g a aproximadamente 300 mg/g en peso seco.

La matriz continua puede formarse por reticulación covalente del polipéptido con el segundo polímero. El enlace covalente puede producirse mediante reacción de grupos funcionales en el polipéptido con grupos funcionales en el
45 segundo polímero. En otras realizaciones, por ejemplo, la reticulación puede producirse mediante reacción de una molécula de reticulación bifuncional tanto con el polipéptido como con el segundo polímero. Por ejemplo, un procedimiento para reticular gelatina y dextrano es modificar el dextrano, tal como oxidación, para formar grupos funcionales adecuados para unión covalente con la gelatina. Una reacción conocida para oxidar polisacáridos es la oxidación de peryodato, tal como se describe en general en *Affinity Chromatography: A Practical Approach*, Dean, y col. IRL, Press, 1985 ISBN0 904147-71-1. La oxidación del dextrano mediante el uso de química basada en
50 peryodato se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.011.008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Usando dichos métodos, puede prepararse una matriz de hidrogel útil de acuerdo con la presente divulgación a temperaturas de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C, o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Adicionalmente, los hidrogeles pueden prepararse a un intervalo de pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 11, de
55 aproximadamente 4 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,6.

En otras realizaciones, la matriz continua reticulada puede prepararse usando un agente de reticulación multifuncional como un resto reactivo que une covalentemente el polipéptido con el segundo polímero. Los agentes de reticulación ejemplares pueden incluir glutaraldehído, epóxidos (por ejemplo, bis-oxiranos), dextrano oxidado, *p*-azidobenzoil hidrazida, éster de *N*-[α -maleimidoacetoxi]succinimida, *p*-azidofenil glioxal monohidrato, bis-[β -(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro, bis[sulfosuccinimidil]suberato, ditiobis[succinimidil]propionato, disuccinimidil suberato, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, y otros reactivos de reticulación bifuncionales conocidos por los expertos en la materia. Como alternativa, puede aplicarse reticulación foto-activada.

El hidrogel usado como la matriz continua puede contener adicionalmente uno o más reactivos de armazón que pueden caracterizarse como potenciadores de la formación del armazón de polímero secundario/polipéptido reticulado o matriz y/o como estabilizante de la matriz. El reactivo del armazón puede incluir cualquier compuesto, especialmente compuestos polares que, cuando se incorporan en la matriz reticulada, potencian la matriz proporcionando mayor estabilidad adicional o ventajas funcionales. En ciertas realizaciones, la matriz puede comprender una cantidad de aminoácidos polares, que se ha definido habitualmente que incluyen tirosina, cisteína, serina, treonina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina. En algunas realizaciones, los aminoácidos pueden seleccionarse específicamente del grupo que consiste en cisteína, arginina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico y mezclas de los mismos, o derivados o análogos de los mismos. Adicionalmente, pueden usarse uno o más quelantes catiónicos divalentes como un reactivo de armazón. Dichos reactivos puedan actuar para aumentar la rigidez de la matriz formando complejos coordinados con cualquier ión metálico divalente presente. Un ejemplo de un quelante catiónico divalente que puede usarse en la presente divulgación es ácido etilendiamintetraacético (EDTA) o una sal del mismo. En realizaciones adicionales, el uso de reactivos de armazón puede comprender sales metálicas, tales como sulfato de cinc.

Cuando están presentes reactivos de armazón, los reactivos de armazón pueden estar presentes en una concentración de aproximadamente 0,05 mg/g a aproximadamente 40 mg/g, de aproximadamente 0,1 mg/g a aproximadamente 30 mg/g o de aproximadamente 0,25 mg/g a aproximadamente 20 mg/g en peso seco.

La matriz de hidrogel puede incluir un tampón fisiológicamente compatible. Un ejemplo es el Medio 199, una solución nutriente habitual usada para cultivo *in vitro* de diversos tipos celulares de mamífero (disponible en el mercado de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), que puede complementarse adicionalmente con aditivos y cantidades adicionales de algunos componentes del medio, tales como cantidades complementarias de aminoácidos polares como se ha descrito anteriormente. Otros ejemplos de tampones adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato (por ejemplo, que comprende cloruro sódico 137 mM, fosfato sódico 10 mM y cloruro potásico 2,7 mM y que tiene un pH de 7,4) y acetato sódico. Pueden usarse en la composición aún más tampones de pH.

La matriz de hidrogel también puede incluir uno o más agentes de ajustes de osmolalidad. Por ejemplo, pueden usarse sales metálicas, tales como cloruro sódico. Cuando estén presentes agentes de ajuste de la osmolalidad, los agentes de ajuste de la osmolalidad pueden estar presentes en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/g a aproximadamente 5 mg/g, de aproximadamente 0,25 mg/g a aproximadamente 4 mg/g o de aproximadamente 0,05 mg/g a aproximadamente 2 mg/g en peso seco.

Además de las partículas osteoconductoras, las composiciones de la presente divulgación pueden incluir uno o más materiales adicionales que pueden ser útiles cuando se aplican al hueso o a vacíos óseos. Por ejemplo, las composiciones desveladas pueden comprender uno o más materiales osteoinductores. Los ejemplos no limitantes de materiales osteoinductores que pueden incluirse en las composiciones desveladas incluyen proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de permeabilidad vascular (VPF), moléculas de adhesión celular (CAM), plasma rico en plaquetas, péptidos naturales o sintéticos, aspirados de la médula ósea y combinaciones de los mismos.

Las composiciones de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender además uno o más medicamentos útiles para tratar a pacientes que tienen daño del tejido conectivo o que necesiten regeneración de tejido conectivo, particularmente regeneración ósea. El medicamento puede ser cualquier medicamento útil para facilitar el proceso de curación y regenerativo. Dichos medicamentos útiles de acuerdo con la divulgación pueden incluir, pero sin limitación, antivirales, antibacterianos, antiinflamatorios, inmunosupresores, analgésicos, anticoagulantes, agentes promotores de la curación de heridas y combinaciones de los mismos.

Si se desea, las composiciones de acuerdo con la presente divulgación también pueden comprender células. Por ejemplo, pueden usarse células madre o progenitoras, tales como células ADAS, en las composiciones desveladas en el presente documento. En particular, las células útiles pueden incluir cualquier célula que sea útil para diferenciar en linajes adipogénicos, osteogénicos, condrogénicos y/o miogénicos.

Pueden encontrarse ejemplos adicionales con respecto a la preparación de una matriz de hidrogel reticulada, materiales para su uso en la preparación de una matriz de hidrogel reticulada, y características de los mismos en la Patente de Estados Unidos n.º 8.053.423. Aunque la presente composición comprende particularmente una matriz

reticulada, la divulgación no excluye necesariamente hidrogeles no reticulados, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos n.º 6.231.881 y Patente de Estados Unidos n.º 6.261.587. Aún más hidrogeles que pueden añadirse a la composición de la presente divulgación o pueden modificarse para reticulación y uso de acuerdo con la presente divulgación se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 5.614.205, Patente de Estados Unidos n.º 5.824.331, Patente de Estados Unidos n.º 5.776.324, Patente de Estados Unidos n.º 5.908.633, Patente de Estados Unidos n.º 5.922.339, Patente de Estados Unidos n.º 6.352.707, Patente de Estados Unidos n.º 6.713.079 y Patente de Estados Unidos n.º 7.700.660.

La composición de la divulgación preferentemente se forma mediante un procedimiento de preparación que no afecta negativamente a las propiedades de rendimiento de los componentes de la composición. Por ejemplo, se ha descubierto que el orden de adición de componentes en el proceso de formación de la composición puede tener una influencia significativa en la utilidad clínica de la composición final. Específicamente, se ha descubierto que cuando la composición se preparó combinando todos los componentes de la composición simultáneamente (por ejemplo, combinando el polipéptido, el polisacárido, las partículas porosas, osteoconductoras, cualquier reactivo de armazón y cualquier agente de reticulación), el producto final era parcialmente soluble en agua templada y era sorprendentemente citotóxico en ensayos de cultivo celular *in vitro*. Se obtuvieron resultados similares en ensayos en los que el polisacárido y las partículas porosas osteoconductoras se premezclaron antes de la adición del componente polipeptídico.

Por otro lado, se descubrió que la premezcla del polipéptido y las partículas porosas osteoconductoras antes de la adición del polisacárido no condujo a los resultados inaceptables indicados anteriormente sino que más bien proporcionó un producto final altamente útil en regeneración ósea, como se analiza en otra parte en el presente documento. Aunque sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que el área de superficie alta de las partículas porosas osteoconductoras puede provocar que las partículas se unan de forma competitiva con el componente polisacárido en perjuicio de la composición general evitando reticulación necesaria entre el polipéptido y el polisacárido.

Se ha descubierto de acuerdo con la presente divulgación, sin embargo, que la precarga de las partículas porosas osteoconductoras con un material biocompatible antes del contacto con el componente polisacárido de la composición puede reducir o eliminar la unión competitiva y facilitar la formación del producto final útil. En realizaciones específicas, el material biocompatible con el que se precargan las partículas porosas osteoconductoras puede ser un polipéptido. Además, el polipéptido usado para precargar las partículas porosas osteoconductoras puede ser el mismo material polipeptídico usado en la formación de la composición final. Por ejemplo, las partículas porosas osteoconductoras pueden añadirse a una solución del material polipeptídico en condiciones suficientes para permitir que los fragmentos del polipéptido penetren en las redes porosas de las partículas y se adsorban en las mismas. Por lo tanto, el material biocompatible (por ejemplo, un polipéptido) puede unirse con una superficie de las partículas, incluyendo superficies dentro de los poros de las partículas. Más específicamente, el material biocompatible puede llenar al menos parcialmente los poros de las partículas porosas osteoconductoras.

Aunque puede ser beneficioso que el material biocompatible usado en la precarga de las partículas porosas osteoconductoras sea el mismo polipéptido usado en la formación de la composición final, la divulgación no se limita necesariamente a dichas realizaciones. En su lugar, podrían usarse otros polipéptidos (tales como los desvelados en el presente documento) como el material de precarga. Además, otros materiales beneficiosos podrían usarse como el componente de precarga, tales como medicamentos, factores de crecimiento, células o similares. Además, las partículas porosas osteoconductoras pueden precargarse con un material que es biocompatible pero es relativamente inerte en relación con la reticulación de la composición o el uso de la composición en la regeneración ósea. Aunque pueden usarse otros materiales en la precarga de las partículas porosas osteoconductoras, aún puede ser beneficioso de acuerdo con la presente divulgación premezclar las partículas porosas osteoconductoras con una solución del material polipeptídico antes de la adición del material polisacárido u otro segundo polímero.

Cuando se usa el polipéptido de la composición como el material de precarga, puede ser beneficioso mezclar las partículas porosas osteoconductoras con una solución del polipéptido a una temperatura mayor que el ambiente durante un periodo de tiempo definido. Por ejemplo, puede llevarse a cabo mezcla a una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C, o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Dicha mezcla puede llevarse a cabo durante un tiempo de aproximadamente 5 minutos o más, aproximadamente 10 minutos o más, aproximadamente 20 minutos o más, aproximadamente 30 minutos o más, o aproximadamente 1 hora o más. En algunas realizaciones, la mezcla puede llevarse a cabo durante un tiempo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 horas, o de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 2 horas. En ciertas realizaciones, cualquier reactivo de armazón y otros aditivos para añadir a la composición (por ejemplo, aminoácidos polares, EDTA, sulfato de cinc, ajustadores de pH) puede combinarse con la solución polipeptídica antes o después de la adición de las partículas porosas osteoconductoras.

Una vez que se han combinado el material polipeptídico y las partículas porosas osteoconductoras, puede añadirse el segundo polímero, preferentemente con mezcla. El segundo polímero puede funcionalizarse (por ejemplo, dextrano que se ha oxidado) para facilitar la reticulación, o puede añadirse un agente de reticulación adecuado a la solución que contiene el polipéptido, puede añadirse a la solución que contiene el polisacárido, o puede añadirse a

- la solución que contiene tanto el polipéptido como el polisacárido. El polipéptido y el segundo polímero pueden por lo tanto reticular para formar una matriz continua. La composición puede curarse durante un tiempo de hasta aproximadamente 24 horas, hasta aproximadamente 18 horas o hasta aproximadamente 12 horas para permitir la compleción de la reticulación. Puede permitirse que la reticulación se produzca durante un tiempo de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 18 horas, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 12 horas. Además, la reticulación puede llevarse a cabo a una temperatura elevada, tal como se ha descrito anteriormente, o, como alternativa, después de mezclar todos los materiales, la composición puede enfriarse a temperatura ambiente o por debajo para permitir que la reticulación continúe hasta su compleción.
- En algunas realizaciones, puede ser beneficioso mezclar la solución durante la reticulación para atrapar aire en la matriz y proporcionar un nivel deseado de porosidad a la estructura. La porosidad deseada también puede conseguirse mediante la introducción de materiales solubles sólidos o huecos, así como otros agentes formadores de poros, en la solución antes o durante la reticulación.
- La matriz reticulada con las partículas porosas osteoconductoras dispersadas en la misma puede usarse inmediatamente en el relleno de vacíos óseos o en otros procedimientos para regenerar el tejido conectivo, particularmente el hueso. La matriz reticulada también puede conformarse, tal como por moldeo mientras se produce la reticulación. Por ejemplo, la composición líquida no reticulada o parcialmente reticulada puede verterse en moldes que proporcionan una dimensión uniforme útil en una forma comercial o útil en aplicación específica. Las composiciones reticuladas toman por lo tanto la forma y las dimensiones de los moldes usados.
- En algunas realizaciones, la composición de la matriz continua, reticulada, con las partículas porosas osteoconductoras dispersas en la misma puede deshidratarse. Esto puede proporcionar la composición en una forma estable, lista para almacenamiento que puede usarse por los especialistas clínicos en una diversidad de situaciones y aplicaciones. En realizaciones específicas, la matriz continua reticulada con las partículas porosas osteoconductoras dispersadas en la misma puede deshidratarse para incluir 15 % o menos, 12 % o menos, 10 % o menos o 6 % o menos de humedad en peso. Como se ha observado anteriormente, sin embargo, no se requiere necesariamente deshidratación, y el producto completamente formado e hidratado puede usarse inmediatamente o puede prepararse para su uso en una fecha posterior. Por lo tanto, puede prepararse una composición preparada, hidratada, por el usuario final o puede tomarse para su uso por el usuario final en la forma preparada, hidratada.
- Cuando se usa deshidratación, la deshidratación puede llevarse a cabo usando cualquier método suficiente para proporcionar al producto final las características deseadas como se analiza en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse liofilización. En dichas realizaciones, la composición puede pre congelarse a una primera temperatura para mantener las estructuras y dimensiones de la composición deseadas. A continuación, la composición puede liofilizarse.
- El procedimiento de pre congelación y la temperatura del producto congelado final pueden afectar ambos a la capacidad para liofilizar con éxito el material. El enfriado rápido forma cristales de hielo pequeños. Aunque los cristales pequeños son útiles en la conservación de la estructura, dan como resultado un producto que es más difícil de liofilizar. El enfriamiento más lento da como resultado cristales de hielo mayores y produce canales menos restrictivos en la matriz durante el proceso de secado. La pre congelación a temperaturas por debajo de la temperatura eutéctica, o temperatura de transición del vidrio, es beneficioso para el secado completo de la composición. La congelación inadecuada puede producir pequeños bolsillos de material no congelado que permanece en el producto que puede expandirse y comprometer la estabilidad estructural del producto liofilizado. Después de pre congelar, las temperaturas pueden aplicarse para efectuar sublimación del hielo presente en el material. A continuación, puede llevarse a cabo deshidratación adicional para conseguir el contenido de humedad deseado. Puede realizarse deshidratación adicional a una temperatura que es mayor que en la etapa de sublimación.
- La composición deshidratada puede estar sustancialmente en forma de una única masa. La masa individual puede adaptarse para usos específicos según se desee. Provechosamente, la composición deshidratada puede moldearse. Por ejemplo, la composición deshidratada puede cortarse en cortes de tipo oblea de diversas dimensiones. La composición deshidratada también puede molerse o procesarse de otro modo para estar en una forma en partículas y por tanto moldearse como partículas. La composición deshidratada también puede cortarse en diversas formas y dimensiones para usos específicos, tales como tapones preformados para su uso en reparación de hueso. Por ejemplo, la composición deshidratada puede formarse en una forma y un tamaño normalizados y envasarse para diversos usos. Dicho moldeo puede llevarse a cabo por un fabricante y/o un usuario final. Por ejemplo, la composición deshidratada puede proporcionarse en forma de tiras que son sustancialmente aplanadas que tienen un espesor que es menor que la longitud y anchura de las mismas. Diversas formas y tamaños de la composición moldeada, deshidratada, están abarcados por la presente divulgación. En una realización adicional, la composición deshidratada puede moldearse alrededor de un mandril central para formar tubos porosos útiles para conductos de guía regenerativos de tejido. Estos pueden involucrarse en torno a sitios específicos que pueden requerir o beneficiarse de la regeneración de tejido guiado. Las composiciones deshidratadas también pueden rehidratarse parcialmente para formar masillas y pastas para rellenar vacíos óseos. La composición deshidratada, cuando se rehidrata, puede conservar sus propiedades regenerativas como se describe en el presente documento y puede

utilizarse de acuerdo con los procedimientos de la divulgación tan eficazmente como una composición recién preparada. La rehidratación de la composición puede realizarse de acuerdo con diversos métodos, todos los cuales están abarcados por la presente divulgación. En una realización, la composición deshidratada puede rehidratarse antes de su uso, tal como poniendo en contacto con agua una solución de tampón compatible fisiológicamente, tal como Medio 199, o con aspirados de médula ósea. En otra realización, la composición deshidratada puede colocarse en el sitio que necesite regeneración y después ponerse en contacto con fluidos de rehidratación, tales como agua o solución de tampón fisiológicamente compatible, o aspirados de médula ósea. En otra realización más, la composición deshidratada puede colocarse en el sitio que necesite regeneración y después rehidratarse mediante contacto con fluidos corporales naturales.

10 Se analizan más detalles con respecto a procedimientos de deshidratación que pueden ser útiles en el presente documento en la publicación de Patente de Estados Unidos n.º 2005/0118230 y la Patente de Estados Unidos n.º 7.695.736.

Aunque la composición de la presente divulgación se ha analizado anteriormente con respecto a estar en una forma reticulada en el momento de administración, el uso de la composición no está limitado a esto. En algunas realizaciones, la composición puede proporcionarse en una forma que se adapta para reticulación *in situ*. Por ejemplo, la composición puede proporcionarse en forma de un kit en el que los componentes individuales de la composición pueden combinarse de una diversidad de maneras de modo que el material polipeptídico y el material del segundo polímero se separan. Todos los componentes pueden proporcionarse en una forma seca con instrucciones adecuadas para el orden de combinación de materiales para hidratación y reticulación para formar la matriz continua. Si se desea, las instrucciones pueden incluir dirección para el premezclado del material polipeptídico, premezclando por separado el segundo material polimérico, y combinando las dos mezclas inmediatamente antes de la aplicación o en el momento de aplicación de modo que se produzca reticulación en el sitio de administración. De forma similar, los materiales hidratados pueden proporcionarse en un recipiente por lo que los materiales hidratados se separan pero pueden entremezclarse en el recipiente (por ejemplo, que tiene una membrana de separación que puede dividirse para permitir el entremezclado) o pueden entremezclarse tras la distribución desde el recipiente (por ejemplo, en una jeringa de múltiples cilindros de la que puede distribuirse el contenido deseado del polipéptido hidratado y segundo polímero hidratado). En cualquier caso, se entiende que la composición de la presente divulgación no se limita a estar completamente reticulada en el momento de la administración sino que puede reticularse parcialmente o completamente *in situ*.

30 Una composición deshidratada puede caracterizarse en relación con diversas propiedades físicas, particularmente porosidad. La matriz continua reticulada con las partículas porosas osteoconductoras dispersadas en la misma específicamente pueden caracterizarse por tener poros de interconexión con una mediana del diámetro del poro de aproximadamente 102 μm (variando los tamaños de los poros hasta aproximadamente 820 μm) y una porosidad promedio de aproximadamente el 85 %. En ciertas realizaciones, la matriz puede tener una porosidad de aproximadamente 25 % o mayor, aproximadamente 50 % o mayor, o aproximadamente 75 % o mayor. Más particularmente, la porosidad promedio puede ser de aproximadamente 50 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 92 %, o de aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 %. La mediana del diámetro del poro (volumen) de la matriz puede ser de aproximadamente 25 μm o mayor, aproximadamente 50 μm o mayor, o aproximadamente 75 μm o mayor. Más particularmente, la matriz puede tener una mediana de diámetro de poro (volumen) de aproximadamente 25 μm a aproximadamente 200 μm , de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 175 μm o de aproximadamente 75 μm a aproximadamente 150 μm . La mediana del diámetro de poro (área) de la matriz puede ser de aproximadamente 0,005 μm a aproximadamente 1 μm , de aproximadamente 0,008 μm a aproximadamente 0,5 μm , o de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 0,1 μm . El diámetro de poro promedio de la matriz (calculado como 4 x el volumen/área) puede ser de aproximadamente 0,01 μm a aproximadamente 2 μm , de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1,5 μm , o de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 1 μm . La densidad aparente (medida a 1,52 kPa) de la matriz continua reticulada deshidratada con las partículas porosas osteoconductoras dispersadas en la misma puede ser de aproximadamente 5 g/ml o menos, aproximadamente 2 g/ml o menos, o aproximadamente 1 g/ml o menos. Más específicamente la densidad aparente puede ser de aproximadamente 0,05 g/ml a aproximadamente 5 g/ml, de aproximadamente 0,08 g/ml a aproximadamente 2 g/ml o de aproximadamente 0,1 g/ml a aproximadamente 1 g/ml.

La composición deshidratada puede caracterizarse en relación con la cantidad relativa de los componentes de la misma. Específicamente, las partículas osteoconductoras y la matriz continua reticulada pueden estar presentes en una relación en peso seco definida, tal como aproximadamente 75:25. En ciertas realizaciones, la relación en peso seco de partículas frente a matriz puede ser de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 50:50, de aproximadamente 85:15 a aproximadamente 60:40, o de aproximadamente 80:20 a aproximadamente 70:30. Se proporcionan en la Tabla 1 a continuación intervalos útiles de componentes presentes en formulación para una composición deshidratada de acuerdo con la presente divulgación.

TABLA 1

Componente	Concentración (mg/g)
Partículas osteoconductoras porosas (por ejemplo, hidroxiapatita)	500-900
Vehículo	
Polipéptido (por ejemplo, gelatina – Piel porcina de tipo A)	65-300
Segundo polímero (por ejemplo, dextrano oxidado)	25-200
Agua residual	5-30
Tampones de pH	3-15
Reactivos de armazón	0,5-10
Agente de ajuste de la osmolalidad	0,1-1
Total (mg)	1000

En la tabla anterior, los tampones de pH pueden incluir, por ejemplo, fosfato sódico dibásico, acetato sódico, fosfato potásico monobásico e hidróxido sódico. Los reactivos de armazón particularmente pueden incluir ácido L-glutámico, sal monosódica, monoclóhidrato de L-arginina, acetato de L-lisina, HCl L-cisteína, sulfato de cinc y EDTA disódico. El cloruro sódico es un agente de ajuste de la osmolalidad ejemplar.

La presente divulgación proporciona además diversos procedimientos de uso de las composiciones descritas. Por ejemplo, la composición de la presente divulgación puede usarse en la regeneración del hueso. El uso puede ser en un mamífero, particularmente un ser humano. El área de regeneración del hueso puede ser un área correspondiente a una fractura. El área de regeneración del hueso también puede ser un área de pérdida de hueso. El área de regeneración de hueso puede ser de forma similar en o alrededor de un vacío óseo.

En realizaciones particulares, los métodos y uso de la presente divulgación pueden comprender administrar una composición como se describe en el presente documento en un sitio que necesite regeneración ósea. La composición se administra preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad puede ser un volumen que es de aproximadamente 25 % o más, aproximadamente 50 % o más, o aproximadamente 75 % o más del volumen del vacío óseo. En otras realizaciones la cantidad puede ser un volumen de aproximadamente 25 % a aproximadamente 200 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 150 %, o de aproximadamente 75 % a aproximadamente 125 % del volumen del vacío óseo.

En el uso, la composición de la presente divulgación puede estar en forma deshidratada. Por lo tanto, los métodos y el uso de la presente divulgación pueden comprender rehidratar al menos parcialmente la composición. Dicha rehidratación puede producirse antes, durante o después de la administración de la composición. La rehidratación puede llevarse a cabo usando cualquier fluido adecuado, incluyendo agua, soluciones de tampón biológicamente compatibles y aspirados de médula ósea.

La presente divulgación también abarca kits que comprenden la composición descrita. Los kits pueden incluir además un conjunto de instrucciones para el uso de la composición. El conjunto de instrucciones particularmente puede dirigirse a un proveedor de cuidados sanitarios. El conjunto de instrucciones puede describir etapas para administrar la composición a un vacío óseo en una cantidad eficaz para regenerar el hueso en el vacío. En realizaciones en las que la composición está en una forma deshidratada, el conjunto de instrucciones puede describir además etapas para rehidratar la composición. En particular, el conjunto de instrucciones puede describir combinar la composición con aspirados de médula ósea.

EXPERIMENTAL

Ensayos de rendimiento - Animal

Las características radiográficas, biomecánicas, histológicas y otras de realizaciones ejemplares de composiciones de acuerdo con la presente divulgación (marcadas como "NB3D") se compararon en un modelo de fusión posterolateral de un único nivel de conejo con las del material conocido Sustituto de Injerto de Hueso Bioactivo Vitoss BA y con autoinjerto (control positivo).

La composición de la presente divulgación estaba formada por hidroxiapatita, gelatina, dextrano, fosfato sódico dibásico, ácido L-glutámico, L-arginina, EDTA, L-lisina, cloruro sódico, fosfato potásico, L-cisteína, sulfato de cinc y agua residual. Para preparar la composición, se calentó una solución de gelatina al 24 % de reserva preparada en un tampón fisiológico que contenía aminoácidos polares en un baño de perlas de temperatura controlada a 50 °C (\pm 5 °C). Los gránulos osteoconductores se pesaron, se mezclaron con una masa de agua aproximadamente igual, y se apartaron. Se añadieron los gránulos osteoconductores húmedos, a la solución de gelatina calentada y se mezclaron

para formar una pasta uniforme a 50 °C (\pm 5 °C). Los gránulos osteoconductores, la gelatina y una solución de dextrano oxidado se combinaron a una relación de aproximadamente 1:1:1 y se mezclaron hasta que fueron homogéneos. Puede atraparse aire en la mezcla para crear una matriz porosa mientras que se produce reticulación de la gelatina y dextrano oxidado. Se permitió que una espuma así formada se asentara adicionalmente a temperatura ambiente antes de transferirse a una cámara de curado mantenida a 5 °C (\pm 3 °C) durante 6 a 18 horas. La espuma curada se retiró de su molde, y se transfirió a un recipiente de lavado que contenía un volumen igual de agua purificada. Las espumas se lavaron durante 6 a 18 horas a 5 °C (\pm 3 °C) para retirar cualquier dextrano oxidado residual, no reticulado. Las espumas lavadas se colocaron en una bandeja de liofilización, y se colocaron en un liofilizador con un ciclo programado de temperaturas y presiones bajo control informático. La liofilización se completó típicamente en un periodo de 2 a 5 días. Al final del ciclo de liofilización, las espumas deshidratadas se retiraron del liofilizador, se inspeccionaron con respecto a defectos o vacíos, se esterilizaron por radiación gamma y se apartaron para su uso en los ensayos.

Los materiales de ensayo, desvelados en el presente documento y comparativos, se combinaron cada uno por separado con aspirado de médula ósea ("BMA"). El estudio se realizó en los Laboratorios de Investigación Quirúrgica y Ortopédica de la Universidad de Nueva Gales del Sur. El material de injerto se colocó adyacente al cuerpo vertebral así como entre los procesos adyacentes (10 mm lateral a la línea media) y se realizó en 56 conejos de seis meses de edad. Se usó un taladro neumático (Midas Rex con un taladro M8) para decorticación. Se implantaron tres cm³ de cada material en cada nivel (1,5 cm³ por lateral) para controlar el volumen de material de injerto colocado en cada animal. Las incisiones fasciales se cerraron con sutura absorbible de 3-0 y la piel se aproximó usando sutura de 3-0. Los animales se sacrificaron a las 6 y 12 semanas para inspección macroscópica, clasificación radiográfica usando una escala de Lenke modificada, tomografía microcomputarizada, ensayos mecánicos, histología de parafina, inmunohistoquímica para IL-6, MMP-1, MMP-13 y Catepsina K, histología de PMMA e histomorfometría. El diseño del estudio se representa en la Tabla 2 a continuación.

TABLA 2

Grupo	Tratamiento	Puntos temporales de sacrificio			Animales Totales
		Línea basal*	6 semanas	12 semanas	
1	NB3D (con BMA y autoinjerto)	1	8	8	17
2	NB3D (con BMA)	1	0	8	9
3	Sustituto de Injerto de Hueso Bioactivo Vitoss BA (con BMA)	1	8	8	17
4	Autoinjerto con BMA	1	8	8	17

* Animales de línea basal para histomorfometría solamente

Se proporcionó NB3D a la instalación de ensayo como tiras de 1,5 cm³ estériles envasadas individualmente. Para cada animal, se sumergieron dos tiras de injerto NB3D (1,5 cm³ cada una) en 3 cm³ de BMA durante 5 minutos para hidratar. Para el Grupo de tratamiento 1, se dividieron 3 cm³ de autoinjerto de la cresta iliaca en cantidades de 1,5 cm³ iguales, de las que se colocaron 1 cm³ bilateralmente en el espacio de proceso inter-transverso derecho e izquierdo. A partir del autoinjerto restante, se colocaron 0,5 cm³ en cada una de las dos tiras de injerto NB3D hidratadas, que se colocaron bilateralmente en los procesos transversos decorticados en el espacio inter-transverso en la parte superior de (posterior a) el 1 cm³ de autoinjerto. Para el Grupo de tratamiento 2, el material de NB3D se hidrató con BMA como se ha descrito anteriormente y se colocó bilateralmente en el espacio inter-transverso sin autoinjerto. Para el Grupo de tratamiento 3, se hidrató el Sustituto de Injerto de Hueso Bioactivo Vitoss BA con BMA de acuerdo con el etiquetado del producto. Después de la hidratación de los dos injertos, se cortaron 1,5 cm³ cada uno del Vitoss BA, y se colocaron bilateralmente en el espacio inter-transverso. Para el Grupo 4, se mezclaron 3 cm³ de autoinjerto de la cresta iliaca con 3 cm³ de BMA, se dividieron en cantidades iguales y se colocaron bilateralmente en el espacio inter-transverso. Los criterios de valoración de evaluación del estudio y las descripciones de los métodos usados se perfilan en la Tabla 3. Excepto donde se indique, todas las evaluaciones de criterios de valoración se realizaron en todos los animales en los puntos temporales de 6 y 12 semanas.

TABLA 3

Criterios de valoración de evaluación	Descripción
Inspección general	Presencia de reacciones adversas tras la disección y recogida
Fusión por palpación	Evaluación de la tasa de fusión por palpación manual del sitio de injerto
Radiografía	Clasificación de la continuidad ósea entre procesos transversos

(continuación)

Criterios de valoración de evaluación	Descripción
Tomografía micro-computarizada (μ CT)	Calidad del hueso y continuidad entre los procesos transversos en los planos axial, coronal y sagital; realizado en 2 animales por cada grupo de tratamiento a las 6 y 12 semanas
Biomecánica	Rigidez tensil, carga máxima, energía hasta el fallo y rigidez (palpación manual); animales de 12 semanas
Histología, incluyendo secciones descalcificadas (parafina) y no descalcificadas (PMMA)	Apariencia histológica en regiones de implante adyacentes a y entre los procesos transversos: respuesta inflamatoria y tipos celulares; nueva formación de hueso; presencia o ausencia de necrosis ósea; y presencia o alcance de mielofibrosis
Histomorfometría (secciones de PMMA)	Cantidad de formación de hueso y reabsorción de implante en regiones adyacentes a y entre los procesos transversos
Inmunohistoquímica (secciones de parafina)	Expresión de MMP-1, MMP-13, IL-6 y Catepsina K en regiones de implante adyacentes a y entre los procesos transversos
Órganos distantes	Presencia o ausencia de patología general o histológica en corazón, hígado, riñón, pulmones y bazo

- Se clasificaron radiografías de segmentos vertebrales recogidos por dos observadores con ocultación con respecto a pruebas de nueva formación de hueso y fusión en cada lado de la columna, y la cantidad de formación de hueso entre las apófisis transversas se puntuó usando una escala de 5 puntos (Grado 1, nuevo hueso de 0 a 20 %, y Grado 5, nuevo hueso de 80 % a 100 %). Cualitativamente las radiografías demostraron aumentos progresivos de la radiopacidad en los procesos transversos y en el medio de la fusión en desarrollo para el Grupo 1 (NB3D con BMA y autoinjerto), Grupo 2 (NB3D con BMA) y Grupo 4 (autoinjerto con BMA); para el Grupo 3 (Vitoss BA) se observó formación de nuevo hueso en las apófisis transversas pero no en el medio de sitio de fusión. Para los Grupos 1, 3 y 4 las puntuaciones de nuevo hueso radiográficas medias aumentaron de 6 semanas a 12 semanas (teniendo el Grupo 2 solamente animales de 12 semanas). A las 12 semanas las puntuaciones de nuevo hueso radiográficas medias para los grupos de NB3D (Grupo 1, puntuación media 3,94; Grupo 2, puntuación media 3,56) se comparó favorablemente con el grupo de autoinjerto (Grupo 4, puntuación media 3,94) en contraste con el grupo de Vitoss BA (Grupo 3, puntuación media 1,07).
- La evaluación de tomografía micro-computarizada fue coherente con los hallazgos radiográficos. A las 12 semanas, la tomografía micro-computarizada demostró formación de nuevo hueso a lo largo de las apófisis transversas y en el medio de la masa de fusión y remodelación de injerto extensiva para el Grupo 1 (NB3D con BMA y autoinjerto), Grupo 2 (NB3D con BMA) y Grupo 4 (autoinjerto con BMA); en el Grupo 3 (Vitoss BA) solamente estaba presente formación de nuevo hueso en las apófisis transversas con remodelación de injerto mínima.
- La fusión se evaluó manualmente con respecto a rigidez en palpación manual y se indicaron tasas de fusión comparables en el Grupo 1 (NB3D con BMA y autoinjerto), Grupo 2 (NB3D con BMA) y Grupo 4 (autoinjerto con BMA) a 43 %, 50 % y 38 %, respectivamente. No se valoró que ninguno de los animales del Grupo 3 (Vitoss BA) tuviera fusión por palpación manual.
- Después de la evaluación de la rigidez, se diseccionaron segmentos vertebrales aislados para retirar todo el músculo, tendón y ligamento y se evaluaron en ensayos biomecánicos con respecto a carga pico, rigidez y energía hasta carga pico. La carga pico y energía fueron cada una estadísticamente significativa, y la carga máxima fue estadísticamente significativamente mayor en el Grupo 4 (autoinjerto con BMA) que en el Grupo 3 (Vitoss BA).
- La evaluación histológica de muestras de ensayo tomadas en las apófisis transversas a las 6 semanas y 12 semanas demostró una respuesta osteoconductora con formación de hueso entrelazada y remodelación posterior. La histología en el medio de la masa de fusión (entre las apófisis transversas) también demostró una respuesta osteoconductora con remodelación y el desarrollo de espacios de médula en el Grupo 1 (NB3D con BMA y autoinjerto) y Grupo 4 (autoinjerto con BMA) tanto a las 6 semanas como a las 12 semanas, y en el Grupo 2 (NB3D con BMA) a las 12 semanas (no ensayado a las 6 semanas). En el Grupo 3 (Vitoss BA), la formación de hueso entre las apófisis transversas fue insignificante tanto a las 6 semanas como a las 12 semanas. Estos resultados se confirmaron usando histomorfometría (véase Tabla 4). Debido a la variabilidad de estos datos, sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significación estadística.
- Los resultados de línea basal (tiempo cero) fueron de $9,90 \pm 2,31$ % de hueso para el Grupo 1 (NB3D con BMA y autoinjerto), y $14,45 \pm 1,90$ % de hueso para el Grupo 4 (autoinjerto con BMA).

TABLA 4

Sumario de los Resultados de Análisis Histomorfométrico

	Grupo 1 NB3D (con BMA y autoinjerto)		Grupo 2 NB3D (con BMA)	Grupo 3 Vitoss BA		Grupo 4 Autoinjerto con BMA	
	6 semanas	12 semanas	12 semanas	6 semanas	12 semanas	6 semanas	12 semanas
En Apófisis Transversas							
Hueso	23,10 ± 6,51	23,10 ± 6,67	13,57 ± 8,97	12,34 ± 6,28	17,45 ± 4,68	23,92 ± 4,56	20,83 ± 5,74
Material de injerto residual	36,09 ± 6,33	38,63 ± 8,30	44,84 ± 9,40	52,01 ± 9,98	36,80 ± 12,37	ND	ND
Medio de Masa de Fusión							
Hueso	21,37 ± 8,10	12,40 ± 6,81	6,26 ± 7,26	0,27 ± 0,38	0,77 ± 1,35	19,97 ± 5,87	16,30 ± 2,95
Material de injerto residual	29,83 ± 8,00	33,05 ± 12,37	46,53 ± 19,72	65,72 ± 5,17	60,85 ± 10,32	ND	ND
Total (promedio de ambos sitios)							
Hueso	21,97 ± 6,72	19,19 ± 4,74	10,11 ± 7,67	8,29 ± 4,06	7,77 ± 7,51	22,48 ± 3,05	19,33 ± 4,93
Material de injerto residual	32,83 ± 6,18	35,25 ± 7,53	41,58 ± 17,26	56,51 ± 8,37	51,90 ± 15,99	ND	ND

Todos los valores son porcentaje, media ± desviación típica. ND – el hueso de autoinjerto residual no pudo distinguirse de hueso recién formado.

- 5 El análisis histomorfométrico del material de implante residual a las 12 semanas no fue estadísticamente significativamente diferente entre el Grupo 1 y el Grupo 2 (35,3 % frente a 41,9 %) y aunque estos valores medios fueron menores que en el Grupo 3 (51,9 %), las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

10 La expresión inmunohistológica de MMP-1, MMP-13, IL-6 y Catepsina K se evaluó en el Grupo 1 (NB3D con BMA y autoinjerto), Grupo 3 (Vitoss BA) y Grupo 4 (autoinjerto con BMA) a las 6 semanas, y en todos los grupos (incluyendo el Grupo 2 – NB3D con BMA) a las 12 semanas. La expresión de proteína se redujo de 6 semanas a 12 semanas en todos los grupos excepto para IL-6, que se expresó a intensidad similar a las 6 semanas y a las 12 semanas en el Grupo 3 (Vitoss BA). La intensidad de expresión de cada proteína a las 12 semanas era similar para el Grupo 2 (NB3D con BMA) y el Grupo 1 (NB3D con BMA y autoinjerto).

15 Los modelos de fusión posterolateral proporcionan ensayos rigurosos de materiales de injerto de hueso y por tanto proporcionan información acerca del rendimiento clínico de los materiales. Los materiales de injerto deben rendir no solamente en el hueso del hospedador decorticado sino entre la apófisis transversa para conseguir fusión entre los niveles tratados. La composición de la presente divulgación fue eficaz cuando se mezcló con autoinjerto y BMA así como cuando se mezcló con BMA solamente y se proporcionó un armazón osteoconductor que apoyó la formación de nuevo hueso en las apófisis transversas así como en el medio de la masa de fusión y que se remodeló con el tiempo basándose en todos los criterios de valoración. El material de hidroxiapatita nano-estructurado en la composición desvelada se reabsorbió con el tiempo pero aún tuvo que reabsorberse completamente a las 26 semanas. Por el contrario, Vitoss BA mezclado con BMA proporcionó solamente cantidades insignificantes de nuevo hueso en el medio de la masa de fusión a las 6, 12 y 26 semanas. El ensayo ilustró por lo tanto que las composiciones de la presente divulgación proporcionaban rendimiento mejorado frente a otro relleno de vacío óseo disponible en el mercado.

25 Los expertos en la materia a la que pertenece la presente divulgación se darán cuenta de muchas modificaciones y otras realizaciones teniendo el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. En el presente documento se emplean términos específicos, estos se usan en un sentido solamente genérico y descriptivo.

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

una matriz continua formada por un polipéptido reticulado con un segundo polímero que comprende un polisacárido; y
 5 partículas de un material poroso, osteoconductor dispersadas en la matriz continua; en la que los poros del material osteoconductor tienen un polipéptido adsorbido en los mismos.

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polisacárido es dextrano.

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que uno o ambos de:

10 el polipéptido reticulado con el segundo polímero comprende gelatina; y el polipéptido adsorbido en el material osteoconductor comprende gelatina.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido adsorbido en el material osteoconductor comprende el mismo polipéptido que se reticula con el segundo polímero, o en la que el polipéptido adsorbido en el material osteoconductor comprende un material que es diferente del polipéptido que se reticula con el segundo polímero.
 15

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el material poroso, osteoconductor, se selecciona del grupo que consiste en fosfato cálcico, sulfato cálcico, aluminato cálcico, alúmina, circonita, silicatos de aluminio, polipropileno fumarato, vidrio bioactivo, titanio poroso, aleación de níquel-titanio poroso, tántalo poroso, perlas de cromo-cobalto sinterizado, hueso autólogo, hueso alogénico, hueso xenogénico, coralina y combinaciones de los mismos, particularmente en la que el material poroso, osteoconductor, es hidroxiapatita.
 20

6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que uno o más de:

las partículas del material poroso osteoconductor comprenden macroporos, microporos y nanoporos;
 las partículas del material poroso, osteoconductor tienen un diámetro promedio de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 3000 μm ;
 25 las partículas del material poroso, osteoconductor tienen un diámetro de poro medio (volumen) de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 450 μm ;
 las partículas del material poroso, osteoconductor tienen un diámetro de poro medio (área) de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 60 μm ;
 las partículas del material poroso, osteoconductor tienen una porosidad de aproximadamente 35 % o mayor;
 30 las partículas del material poroso, osteoconductor tienen una área de superficie de aproximadamente 1 m^2/g o mayor; y
 las partículas del material poroso, osteoconductor son amorfas con poros de interconexión.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende además uno o más de un reactivo de armazón, un tampón y un material osteoinductor, particularmente en la que uno o ambos de:

la composición comprende un reactivo de armazón seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos polares, quelantes catiónicos divalentes, y combinaciones de los mismos; y
 la composición comprende un material osteoinductor seleccionado del grupo que consiste en proteínas morfogénicas del hueso (BMP), factores de crecimiento transformante (TGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento epidérmicos (EGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de permeabilidad vascular (VPF), moléculas de adhesión celular (CAM), plasma rico en plaquetas, péptidos naturales o sintéticos, aspirados de médula ósea y combinaciones de los mismos.
 40

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las partículas y la matriz continua están presentes en una relación en peso seco de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 50:50.

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición está deshidratada.

10. Un procedimiento de reparación de una composición de relleno de vacío óseo, comprendiendo el procedimiento:

combinar partículas de un material poroso, osteoconductor, con una solución de un polipéptido para formar una pasta; y
 50 añadir a la pasta un segundo polímero que comprende un polisacárido, en condiciones tales que el polipéptido reticula con el segundo polímero para formar una matriz continua que tiene las partículas del material osteoconductor dispersadas en la misma; en el que antes de dicha etapa de adición, al menos una parte de los poros de las partículas del material osteoconductor tienen un material biocompatible adsorbido en los mismos.
 55

11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que uno o ambos de:
el material biocompatible adsorbido en los poros de las partículas osteoconductoras comprende el polipéptido usado para formar la pasta; y
el segundo polímero está al menos parcialmente solubilizado antes de dicha etapa de adición.
- 5
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el polisacárido es dextrano.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además añadir un reactivo de armazón o un material osteoinductor a la composición, particularmente que comprende uno o ambos de:
añadir un reactivo de armazón seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos polares, quelantes catiónicos divalentes y combinaciones de los mismos; y
añadir aspirados de médula ósea como el material osteoinductor.
- 10
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el polipéptido comprende gelatina.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el material poroso, osteoconductor, se selecciona del grupo que consiste en fosfato cálcico, sulfato cálcico, aluminato cálcico, alúmina, circonita, silicatos de aluminio, polipropileno fumarato, vidrio bioactivo, titanio poroso, aleación de níquel-titanio poroso, tantalita porosa, perlas de cromo-cobalto sinterizado, hueso autólogo, hueso alogénico, hueso xenogénico, coralina y combinaciones de los mismos.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende uno o ambos de:
combinar las partículas del material poroso, osteoconductor, el polipéptido, y el segundo polímero de modo que las partículas y la matriz continua estén presentes en una relación en peso seco de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 50:50; y
deshidratar la composición.
- 20
17. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento de regeneración de hueso, en la que la composición es para aplicar a un vacío óseo, y en la que la composición está en una forma hidratada después de la aplicación.
- 25
18. La composición de la reivindicación 17, en la que la composición está en un estado deshidratado, y en la que la composición es para hidratarse al menos parcialmente antes de su aplicación, particularmente cuando dicha hidratación comprende combinar aspirados de médula ósea con la composición deshidratada.
- 30
19. Un kit que comprende:
uno o más recipientes que contienen una composición que comprende una matriz continua formada por un polipéptido reticulado con un segundo polímero que comprende un polisacárido y partículas de un material poroso, osteoconductor dispersado en la matriz continua, en el que los poros del material osteoconductor tienen un polipéptido adsorbido en los mismos; y
un conjunto de instrucciones dirigido a un proveedor de cuidados sanitarios que describe etapas para administrar la composición a un vacío óseo en una cantidad eficaz para regenerar hueso en el vacío.
- 35
20. El kit de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la composición está en una forma deshidratada, y en el que el conjunto de instrucciones describe, además, etapas para rehidratar la composición, particularmente en el que el conjunto de instrucciones describe combinar la composición con aspirados de médula ósea.
- 40