

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 273**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/54** (2006.01)

**A61L 27/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2008 PCT/EP2008/064677**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09056567**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2008 E 08846101 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2209505**

54 Título: **Proceso para producir partículas cargadas con factores de crecimiento, así como las partículas así obtenidas**

30 Prioridad:

**29.10.2007 DE 102007051914**

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

**24.02.2017**

73 Titular/es:

**JENNISSEN, HERBERT (100.0%)  
ALTE KLOSTERSTRASSE 19  
50858 KÖLN, DE**

72 Inventor/es:

**ZURLINDEN, KRISTIN y  
JENNISSEN, HERBERT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 603 273 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

Proceso para producir partículas cargadas con factores de crecimiento, así como las partículas así obtenidas

- 5 La presente invención se refiere a un proceso para producir material corpuscular (partículas) cargado con factores de crecimiento, a las partículas así obtenidas y a su uso para mejorar la incorporación de los materiales de implante en la sustancia ósea, sobre todo en el caso de los materiales metálicos o cerámicos empleados en implantes tales como huesos y articulaciones artificiales, implantes dentales o incluso implantes de tamaño minúsculo.
- 10 La implantación de huesos o articulaciones artificiales ha adquirido en los años recientes una importancia creciente, p.ej. para el tratamiento de displasias o luxaciones de las articulaciones o de enfermedades que pueden aparecer por el desgaste de las articulaciones debido a malas posiciones de las mismas. La función de los implantes y de los materiales utilizados para su elaboración - que además de metales como el titanio o aleaciones metálicas también pueden comprender cerámica o plásticos como el teflón o las polilactidas - se han ido mejorando continuamente, de manera que tras un proceso de curación efectivo los implantes pueden alcanzar en el 90-95% de los casos una
- 15 duración de 10 años.
- A pesar de estos progresos y de los mejores métodos operativos, una implantación sigue siendo una intervención difícil y gravosa, sobre todo porque conlleva un lento proceso de cicatrización del implante que suele comprender varios meses de estancias clínicas y curas, incluyendo las medidas de rehabilitación. Además de los dolores, la duración del tratamiento y la separación del entorno habitual son grandes molestias para el paciente. Asimismo, el lento proceso de curación es causa de elevados costes de personal sanitario por la necesidad de una asistencia
- 20 intensiva.
- En los últimos años ha aumentado significativamente la comprensión de los procesos a nivel molecular que requiere la incorporación de un implante. Para que un implante sea compatible con los tejidos es decisiva su compatibilidad estructural y superficial. En sentido estricto la biocompatibilidad solo depende de la superficie. Las proteínas tienen un papel importante en todos los niveles de la integración. Como se explica seguidamente, durante la operación de implantación determinan todo el desarrollo de la cicatrización del implante mediante la formación de una capa inicial de proteínas que se adsorbe y sobre la cual se establecen más tarde las primeras células.
- 25 En los últimos años ha aumentado significativamente la comprensión de los procesos a nivel molecular que requiere la incorporación de un implante. Para que un implante sea compatible con los tejidos es decisiva su compatibilidad estructural y superficial. En sentido estricto la biocompatibilidad solo depende de la superficie. Las proteínas tienen un papel importante en todos los niveles de la integración. Como se explica seguidamente, durante la operación de implantación determinan todo el desarrollo de la cicatrización del implante mediante la formación de una capa inicial de proteínas que se adsorbe y sobre la cual se establecen más tarde las primeras células.
- 30 Durante la interacción molecular entre el implante – también denominado biomaterial – y los tejidos se producen múltiples reacciones que parecen seguir un orden jerárquico riguroso. Como primera reacción biológica tiene lugar la adsorción de proteínas a la superficie del biomaterial. A continuación, moléculas individuales de proteínas de la capa proteica formada se transforman en moléculas señalizadoras presentadas en la superficie - por ejemplo mediante variaciones de conformación - o se liberan mediante reacciones catalíticas (proteolíticas) en forma de fragmentos proteicos que actúan como moléculas señalizadoras.
- 35 En la fase siguiente se produce la colonización celular desencadenada por las moléculas señalizadoras, la cual puede incluir una serie de células tales como leucocitos, macrófagos, inmunocitos, y finalmente también células de tejidos (fibroblastos, fibrocitos, osteoblastos, osteocitos). En esta fase juegan un papel decisivo otras moléculas señalizadoras, los denominados mediadores, como p.ej. citocinas, quimiocinas, morfógenos, hormonas tisulares y hormonas auténticas. Por último, si hay biocompatibilidad, el implante se integra en todo el organismo e idealmente se logra un implante permanente.
- 40 A la luz de los trabajos realizados en los últimos años a nivel molecular de la osteogénesis, han cobrado creciente importancia las moléculas de señalización química, las denominadas "proteínas morfogénicas del hueso" (BMP-1-BMP-15), que influyen en el crecimiento óseo. Las BMP (en especial BMP-2 y BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7) son proteínas osteoinductivas que estimulan la formación y consolidación ósea promoviendo la proliferación de células precursoras y su diferenciación en osteoblastos. Además favorecen la formación de fosfatasa alcalina, receptores hormonales, sustancias específicas del hueso como el colágeno de tipo 1, la osteocalcina, la osteopontina, y por último la mineralización.
- 45 A la luz de los trabajos realizados en los últimos años a nivel molecular de la osteogénesis, han cobrado creciente importancia las moléculas de señalización química, las denominadas "proteínas morfogénicas del hueso" (BMP-1-BMP-15), que influyen en el crecimiento óseo. Las BMP (en especial BMP-2 y BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7) son proteínas osteoinductivas que estimulan la formación y consolidación ósea promoviendo la proliferación de células precursoras y su diferenciación en osteoblastos. Además favorecen la formación de fosfatasa alcalina, receptores hormonales, sustancias específicas del hueso como el colágeno de tipo 1, la osteocalcina, la osteopontina, y por último la mineralización.
- 50 En este proceso las moléculas BMP regulan las tres reacciones clave: la quimiotaxis, la mitosis y la diferenciación de las correspondientes células precursoras. Asimismo las BMP tienen un papel importante en la embriogénesis, la organogénesis del hueso y otros tejidos, cuyas células finales conocidas son los osteoblastos, los condroblastos, los mioblastos y las células musculares lisas (inhibición de la proliferación por BMP-2).
- Hasta ahora se conocen 15 BMP, incluyendo múltiples isoformas. Exceptuando la BMP-1, las BMP pertenecen a la superfamilia del "factor de crecimiento transformador-beta" (TGF- $\beta$ ), de la cual se detectaron receptores específicos en las superficies de las respectivas células. Como ha demostrado el uso efectivo de BMP-2 y/o BMP-7 humanas recombinantes en ensayos de procesos de consolidación defectuosos en ratas, perros, conejos y monos, no parece existir ninguna especificidad de especie.
- 60 Del estado técnico se conocen múltiples trabajos en el campo de los materiales y partículas cargadas que se usan para favorecer el crecimiento de la sustancia ósea. Los estudios sobre las uniones de la BMP-2 al hidroxilapatito
- 65

(HAP) se remontan a los orígenes de la investigación de las BMP, cuando Urist comprobó en 1984 que las BMP se pueden purificar cromatográficamente en una columna de hidroxilapatito. También en el mismo año Urist describió un agregado de BMP y TCP que inducía la formación de cartilago en ratones (US 4,596,574). En los siguientes 20 años apareció una serie de trabajos sobre el uso de una combinación de fosfatos de calcio (hidroxilapatito, fosfato tricálcico) con BMP-2, en los que se describía entre otras cosas que la BMP-2 se mezcla en una proporción definida con colágeno o hidroxilapatito (HAP) y la combinación se liofiliza inmediatamente y se utiliza tras la liofilización. En otro trabajo se estudia la adsorción de rhBMP-2, desnaturalizada en presencia de un agente de desnaturalización como la urea, al hidroxilapatito. Sin embargo, incluso en condiciones tan drásticas, solo se unen al hidroxilapatito cantidades muy pequeñas de BMP-2.

En el estado técnico (K. Zurlinden y otros, Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2005, 36, nº 12) se revela además que la ubiquitina y la rhBPM-2 se pueden inmovilizar sobre hidroxilapatito una vez activadas químicamente.

Actualmente la BMP-2 se puede aplicar terapéuticamente como Induct Os® (Wyeth) sobre una “esponja de colágeno absorbible” o en forma del Ossigraft® (Stryker). Sin embargo estos materiales tienen en común que la concentración de BMP empleada por unidad de volumen es relativamente pequeña, en concreto una demanda volumétrica ~ 2 ml de partículas o de “esponja” para 1 mg de BMP-2. Solamente pueden disolverse mayores cantidades de BMP-2 en condiciones no fisiológicas, tales como valores extremos de pH en el intervalo alcalino o ácido, o en presencia de detergentes a pH neutro. En muchos casos estas cantidades no son suficientes para una aplicación de la BMP-2 adecuada al tamaño de la lesión ni para una estimulación óptima del crecimiento óseo, sobre todo en presencia de otros materiales de sustitución ósea. Además, en estas formas de aplicación es perjudicial que la BMP-2 solo esté disponible simultáneamente para el organismo en una única fase temprana de liberación (“fase de aceleración”) a causa de una insuficiente unión al colágeno.

La presente invención abajo descrita está basada en la observación de que mediante la adsorción de BMP-2 a un material corpuscular - constituido especialmente por material inorgánico de sustitución ósea como hidroxilapatito, fosfato tricálcico, carbonato cálcico, óxido de aluminio o mezclas de ellos, sobre todo bi- o trifásicas – se puede obtener sobre la fase sólida una mayor cantidad de BMP, en particular de BMP-2 por fracción volumétrica, respecto a los materiales arriba citados, si la etapa de adsorción se efectúa durante un periodo de tiempo suficientemente largo de al menos 30 minutos y a un valor de pH controlado entre 4 y 5. Tras la etapa de adsorción tiene lugar como segunda etapa, al menos, un crecimiento extensivo con una solución tampón exenta de factor de crecimiento óseo cuyo volumen es igual como mínimo al volumen empleado de fase sólida, preferiblemente con un volumen de líquido al menos 10 veces superior. De esta manera se puede asegurar la eliminación de la cantidad de BMP-2 disuelta en la fase líquida. Así se puede reducir claramente la llamada fase de aceleración al 1-2% de la cantidad de BMP-2 adsorbida. Ello permite aplicar dosis elevadas de BMP-2 sobre una mínima área. El recubrimiento de la superficie en solución acuosa tamponada tiene lugar en el intervalo ácido entre pH 4 y 5, sobre todo a pH 4,5. Además es conveniente que el material corpuscular sea biorresorbible.

En el proceso de la presente invención, la adsorción como forma de unión química debe distinguirse de:

- Mezcla/combinación con HAP o con TCP (= mezcla)
- Inclusión/atrapamiento, p.ej. en poros
- Incorporación: p.ej. mediante liofilización del líquido y precipitación en el material
- Recubrimiento de metales o materiales cerámicos, tras lo cual se sumergen partículas o piezas de moldeo p.ej. en una solución de BMP e inmediatamente se someten a un secado para eliminar la solución [por tanto la BMP-2 seca sobre la superficie formando una capa (= adhesión, no adsorción)]

En las condiciones del proceso de la presente invención se absorbe sobre la superficie una elevada cantidad de factor de crecimiento óseo que no puede eliminarse de las partículas por lavado. En estudios de fijación de BMP-2 (tabla 1) a distintos hidroxilapatitos llevados a cabo por los presentes inventores se encontró sorprendentemente que las BMP, en concreto la BMP-2, se pueden unir linealmente al fosfato cálcico en grandes cantidades, dentro de un amplio intervalo.

**Tabla 1**

<b>Adsorción de BMP-2 (a pH 4,5) y desorción de BMP-2 (a pH 7,4) en diferentes materiales granulados de sustitución ósea</b>								
BMP-2 en receta de incubación	Algisorb® (80% TCP, 20% HAP)		Algipore® (98% HAP)		Bonit® (13% SiO <sub>2</sub> , 52% HAP, 35% TCP)		NuOss® (HAP, bovino)	
	Control	APS	Control	APS	Control	APS	Control	APS
Adsorción de BMP-2, mg/g								
0,1	0,53	0,78	0,58	0,81	0,26	0,23	0,45	0,69
0,2	1,06	1,54	1,27	1,52	0,52	0,39	0,61	1,16
0,3	1,35	2,14	1,52	2,27	0,67	0,52	0,98	1,41
Desorción, t <sub>1/2</sub> , días								
Vida media	20,4	31,6			10,1	5,4	28,2	30,8

En la tabla 1 están representados los resultados de los ensayos de adsorción a pH 4,5 (acetato Na 20 mM, pH 4,5), en los cuales la adsorción/incubación se realiza durante un periodo de tiempo de al menos 30 minutos ( $t_{1/2} = 16$  d), preferiblemente durante al menos 1-2 horas ( $t_{1/2} = 19$  d) y con especial preferencia durante al menos 4-6 horas ( $t_{1/2} = 20$  d). Los tiempos de vida media más largos se observaron para incubaciones de 15-17 ( $t_{1/2} = 23$  d).

Tras la adsorción de la BMP-2 sobre el material corpuscular se mide la liberación (desorción). Para ello las muestras se transfieren a 2 ml de tampón (Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Tras unos tiempos prefijados las muestras se extraen, se lavan en 3 x 2 ml de tampón (Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y se miden en un contador  $\gamma$ . Después se transfieren a 2 ml de tampón fresco para el siguiente periodo de liberación. La cantidad de BMP-2 inmovilizada se determina mediante el uso de proteína marcada radiactivamente con yodo 125 y la medición en el contador  $\gamma$ .

Todos los materiales de sustitución ósea se incubaron a temperatura ambiente con la concentración indicada de BMP-2 en tampón de acetato Na 20 mM, pH 4,5 durante 15 horas. La desorción se determinó en Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Los tiempos de vida media de la liberación en la llamada "fase de aceleración" – que solo afecta al 1-2% de la cantidad de BMP-2 adsorbida – fueron de 0,4-1,1 días (no representados). APS: aminopropil-trietoxisilano (no incluido en la presente invención); Algipore® (densidad  $\sim 0,63$  g/cm<sup>3</sup>;  $1,3 \times 10^4$  partículas/g) y Algisorb® (densidad  $\sim 0,63$  g/cm<sup>3</sup>;  $1,3 \times 10^4$  partículas/g) de la firma Algoss GmbH, Viena; Bonit®, de la firma DOT GmbH, Rostock; matriz de colágeno NuOss®, de la firma ACE Surgical Supply Co. (Brockton, MA, USA).

La presente invención se ilustra con mayor detalle mediante las figuras adjuntas:

Figura 1: muestra la ultraestructura de una partícula de Algipore® obtenida de algas calcáreas (la barra de escala corresponde a 10  $\mu$ m. El Algisorb® posee la misma estructura. (De "Bone Augmentation in Oral Implantology [Acrecimiento óseo en implantología oral]", Khoury, F. y otros, página 349, 2007, ediciones Quintessenz GmbH, Berlín);

Figura 2: detección de la actividad biológica de la rhBMP-2 adsorbida sobre Algisorb (C y D) en el cultivo con células MC3T3-E1:

A. Algisorb, control negativo – no hay rhBMP-2 soluble en el medio;

B. Algisorb, control positivo – adición de 50 nM de rhBMP-2 soluble al medio;

C. rh BMP-2 adsorbida sobre Algisorb - ( $\sim 0,5$  mg rhBMP-2 por g de Algisorb) (mantenido húmedo);

D. rh BMP-2 adsorbida sobre Algisorb - ( $\sim 0,5$  mg rhBMP-2 por g de Algisorb) (secado);

Figura 3A: adsorción hidrófila e hidrófoba de rhBMP-2; y

Figura 3B: liberación de rhBMP-2 (reacción de primer orden).

La fig. 1 muestra una fotografía al microscopio electrónico del Algipore® microestructurado procedente de una alga calcárea (de la firma Algoss GmbH, Viena), el cual tiene un comportamiento de incorporación y resorción mejor que otros tipos de hidroxilapatito. El CaCO<sub>3</sub> original del alga calcárea roja Cochlearia officinalis está reemplazado por hidroxilapatito (HAP) (Algipore®) o fosfato tricálcico (TCP) (Algisorb®) [1].

Tal como se muestra en la figura 2, la actividad biológica de la rhBMP-2 adsorbida sobre Algisorb se pudo detectar en el cultivo con células MC3T3-E1. Para ello se sembraron en condiciones estériles  $5 \times 10^5$  células MC3T3-E1 recién tripsinizadas sobre partículas de Algisorb fijadas por el lado inferior con adhesivo de fibrina en los pocillos de una placa de microvaloración de 48 pocillos y se incubaron en medio Alpha-MEM (Gibco) con SBF al 10%. 6-12 h después el medio de las células desarrolladas de forma confluyente sobre las plaquitas se sustituyó por medio Alpha-MEM fresco con 1% de SBF y las células siguieron creciendo durante 6 días sobre el control de Algisorb o sobre Algisorb (no funcionalizado con APS) con BMP-2 adsorbida. Después de los 6 días, las partículas de Algisorb colonizadas por las células se lavaron con tampón de fosfato Dulbecco y se fijaron con paraformaldehído al 2%. La fosfatasa alcalina (colorante fluorescente verde) se fotografió y se determinó con el kit de detección de fosfatasa ELF-97 (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, cámara de 10 megapíxeles, Nikon GmbH, Düsseldorf, Alemania, longitud de onda de excitación 345 nm, longitud de onda de emisión 530 nm).

En la figura 3 se puede apreciar lo siguiente respecto a las propiedades de la fase sólida de alta densidad cargada con BMP-2 según la presente invención. A partir de un número  $\cong 1,3 \times 10^4$  de partículas/g de Algisorb, para una carga de rhBMP-2 de 6,7 mg/g se puede calcular que hay 0,5  $\mu$ g de rhBMP-2 unidos a cada partícula. Esto significa que bastan 2 partículas (= 1  $\mu$ g) para producir una inducción ósea significativa en un ensayo con ovejas [2].

Según los conocimientos de los presentes inventores las mejores propiedades del Algipore residen en el sistema de poros interconectados y en la existencia de partículas de hidroxilapatito isotropas (es decir amorfas) al contrario que el hidroxilapatito altamente cristalino de Bio-Oss (de la firma Geistlich). La variante que contiene fosfato tricálcico, el Algisorb®, tiene según los estudios efectuados hasta la fecha un comportamiento de resorción aún mejor que el Algipore.

El comportamiento de fijación no es exclusivo del Algipore y del Algisorb, en otros tipos de hidroxilapatito también se encuentra un comportamiento semejante. La peculiaridad del Algipore y del Algisorb es que las cantidades fijadas puede ser de 1-2 mg/g y superiores. Tales valores no eran conocidos hasta la fecha en el estado técnico. El proceso

de la presente invención permite obtener más de 7 mg de BMP2/g de partícula ( $2,8-4,4 \text{ mg/cm}^3$ ) (fase sólida de alta densidad cargada con BMP-2).

De la referencia [1] se pueden obtener informaciones sobre los materiales Algipore y Algisorb utilizados conforme a la presente invención. Entre ellos se puede emplear especialmente según la presente invención el Algipore®: 98% de hidroxilapatito HA - monofásico, y el Algisorb®: 80% de fosfato tricálcico  $\beta$ -TCP, 19,3% de HA, 0,7% de calcita,  $\text{CaCO}_3$  - bi/trifásico. Del último se pueden usar todas las variantes bi/trifásicas de  $\beta$ -TCP y HA con igual estructura electromicroscópica. En ellas el contenido de calcita es del 0,3-0,7%.

Las investigaciones de los presentes inventores sobre las propiedades de la fase sólida de alta densidad cargada con BMP-2 han dado como resultado que a partir de un número  $\cong 1,3 \times 10^4$  de partículas/g de Algisorb, para una carga de rhBMP-2 de 6,7 mg/g (fig. 1) se puede calcular que hay 0,5  $\mu\text{g}$  de rhBMP-2 unidos a cada partícula. Esto significa que bastan 2 partículas (= 1  $\mu\text{g}$ ) para producir una inducción ósea significativa en un ensayo con ovejas [2]. Así se puede aplicar rhBMP-2 *in vivo* y clínicamente de forma nueva y racional, sin pérdidas por difusión.

La preparación de la fase sólida de alta densidad cargada con BMP-2 conforme a la presente invención corresponde entonces a un nivel en que el contenido de BMP-2 por unidad de volumen es superior a la concentración que se puede alcanzar en soluciones acuosas. Para ello las soluciones tamponadas de BMP, preferentemente de BMP-2, se usan preferiblemente a una concentración de 0,1 hasta 1,5 mg/ml de solución tampón, sobre todo de 0,5 hasta 1,5 mg/ml de solución tampón. Una solución tampón con esta concentración de BMP se añade a las partículas en una cantidad apropiada para obtener la carga deseada en mg de BMP por g de partícula. Por ejemplo, si se desea una carga de 2,5 mg de BMP por g de partícula, hay que añadir 5 ml de una solución tampón que contenga 1 mg de BMP por ml a 2 g de partículas. No obstante, si el volumen de la preparación aumenta respecto a la pesada, por ejemplo el cuádruple, entonces solo se fijan 7 mg/g de partícula en vez de 10 mg/g de partícula.

Otros estudios aún no concluidos de los presentes inventores demuestran que se pueden alcanzar valores más altos (desde 4-5 mg de BMP hasta 8-10 mg de BMP por g de partícula). Por lo tanto se puede usar una cantidad en ml de solución tampón ajustada a la concentración de su contenido en BMP. Por consiguiente, para la aplicación de las partículas cargadas con factores de crecimiento óseo según la presente invención es suficiente el uso de unos pocos gránulos del compuesto BMP-HAP (p.ej. junto con un implante o en un acrecimiento óseo del seno maxilar) para producir una inducción ósea. Los ensayos *in vitro* de los presentes inventores demuestran que la BMP-2 unida al HAP es biológicamente activa. Actualmente los presentes inventores están llevando a cabo otras pruebas con ovejas.

Para evitar la fase de aceleración, es decir la liberación excesiva de factores de crecimiento óseo no adsorbidos en la superficie de las partículas, sino simplemente depositados sobre ella, tras la etapa de adsorción las partículas se lavan preferiblemente 3 veces con un volumen 10 veces superior al del material corpuscular en una solución tampón exenta de factores de crecimiento óseo (tampón de acetato Na 20 mM, pH 4,5). Después tiene lugar un lavado quíntuple en tampón de PBS de pH 7,4 (NaCl 137 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM, pH 7,4).

El aporte de la fase sólida de alta densidad cargada con BMP permite aplicar especialmente la rhBMP-2 *in vivo* y clínicamente de forma nueva y racional, sin pérdidas por difusión. Se ha comprobado que, una vez liofilizada, la fase sólida de alta densidad cargada con BMP-2 se puede almacenar durante varias semanas sin que pierda actividad (véase fig. 2). Los primeros estudios de los presentes inventores demuestran que la fase sólida de alta densidad cargada con BMP se puede conservar almacenada hasta 1-2 años. Durante este tiempo se mantiene la actividad biológica de la BMP gracias, según los presentes inventores, al uso preferente de los materiales en condiciones estériles.

#### Literatura

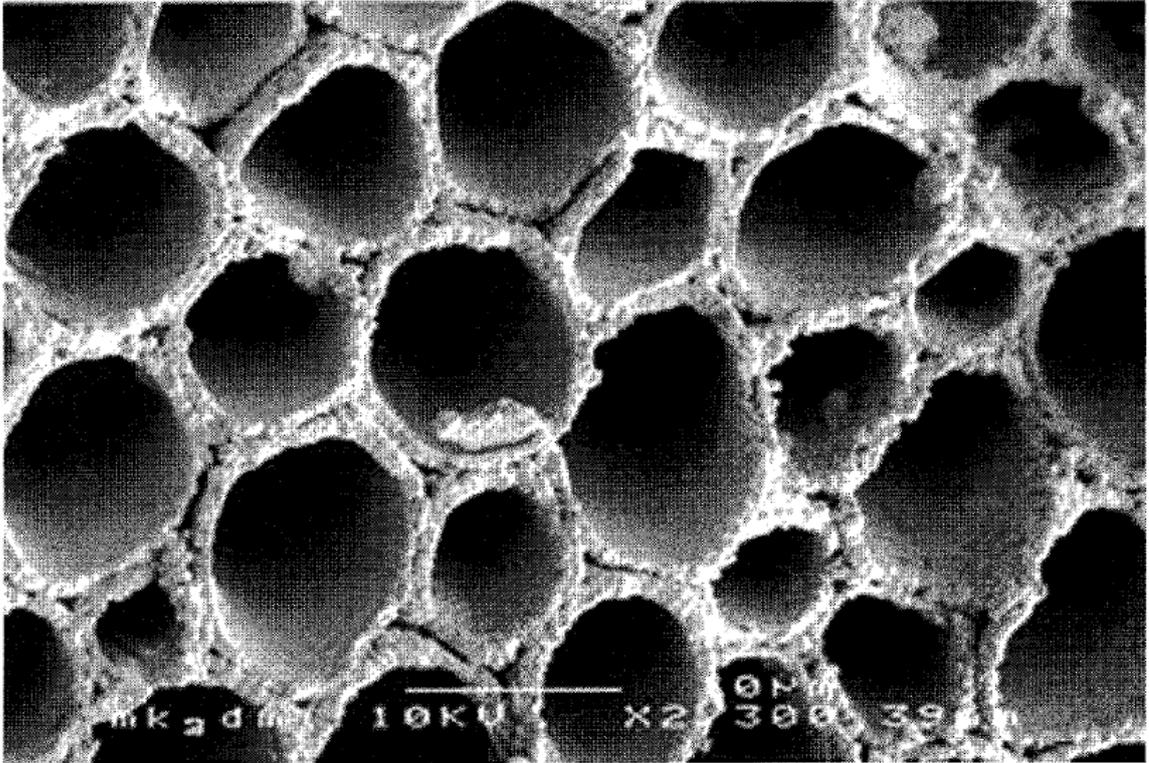
[1] Spassova, E., Gintenreiter, S., Halwax, E., Moser, D., Schopper, C., & Ewers, R. (2007) Chemistry, Ultrastructure and Porosity of Monophasic and Biphasic Bone Forming Materials Derived from Marine Algae [Química, ultraestructura y porosidad de materiales monofásicos y bifásicos formadores de hueso procedentes de algas marinas]. Materialwiss. Werkstofftech., 38, 1027-1034.

[2] Lichtinger, T.K., Müller, R.T., Schürmann, N., Wiemann, M., Chatzinikoleidou, M., Rumpf, H.M., & Jennissen, H.P. (2001) Osseointegration of Titanium Implants by Addition of Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2) [Integración ósea de implantes de titanio mediante la adición de la proteína morfogénica de hueso 2 recombinante (rhBMP-2)]. Materialwiss. Werkstofftech., 32, 937-941.

**REIVINDICACIONES**

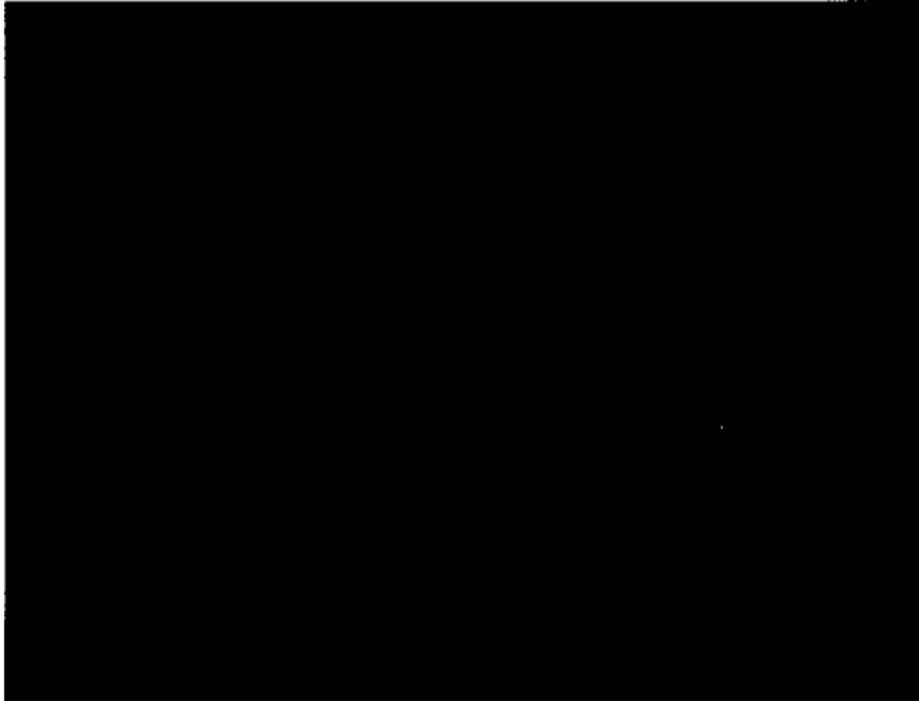
- 5 1. Proceso para preparar material inorgánico corpuscular cargado con factores de crecimiento, que consiste en tratar un material inorgánico corpuscular formado por hidroxilapatito, fosfato tricálcico, carbonato cálcico, óxido de aluminio o mezclas de ellos con factores de crecimiento en solución acuosa tamponada en el intervalo ácido entre pH 4 y 5 durante un periodo de tiempo de al menos 30 minutos, separarlo de la solución acuosa tamponada y lavarlo como mínimo una vez con al menos el mismo volumen de una solución tampón libre de factores de crecimiento.
- 10 2. Proceso según la reivindicación 1, en el cual el material corpuscular se seca después de la etapa de lavado con la solución tampón libre de factores de crecimiento.
3. Proceso según la reivindicación 2, en el cual la etapa de secado incluye una liofilización.
- 15 4. Proceso según la reivindicación 1, 2 o 3, en el cual la solución acuosa tamponada tiene un valor de pH de 4,3 hasta 4,7, sobre todo de 4,5.
- 20 5. Proceso según una de las reivindicaciones 1 hasta 4, en el cual el material corpuscular tiene un tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 10 hasta 500  $\mu\text{m}$  y una estructura de poros interconectados.
6. Proceso según una de las reivindicaciones anteriores, en el cual se emplea BMP-2 o BMP-7 como factor de crecimiento.
7. Material corpuscular obtenible mediante el proceso según una de las reivindicaciones anteriores.
- 25 8. Uso del material corpuscular según la reivindicación 7 para preparar una composición farmacéutica destinada a incrementar el crecimiento óseo.

Fig. 1



**Figura 2/3**

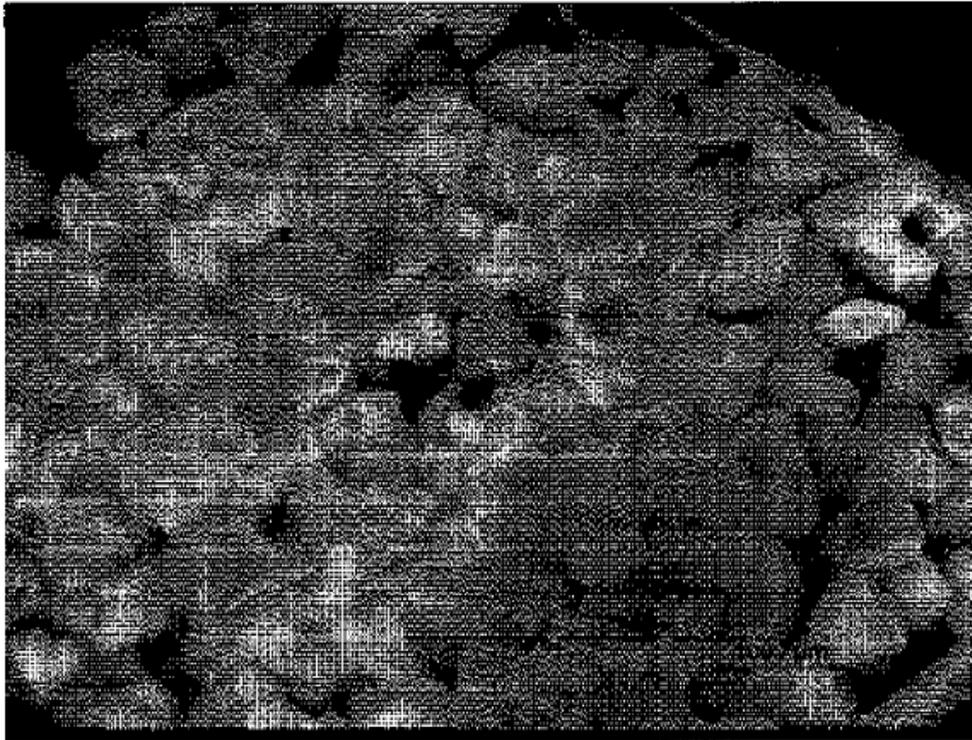
**A.**



**B.**



C.

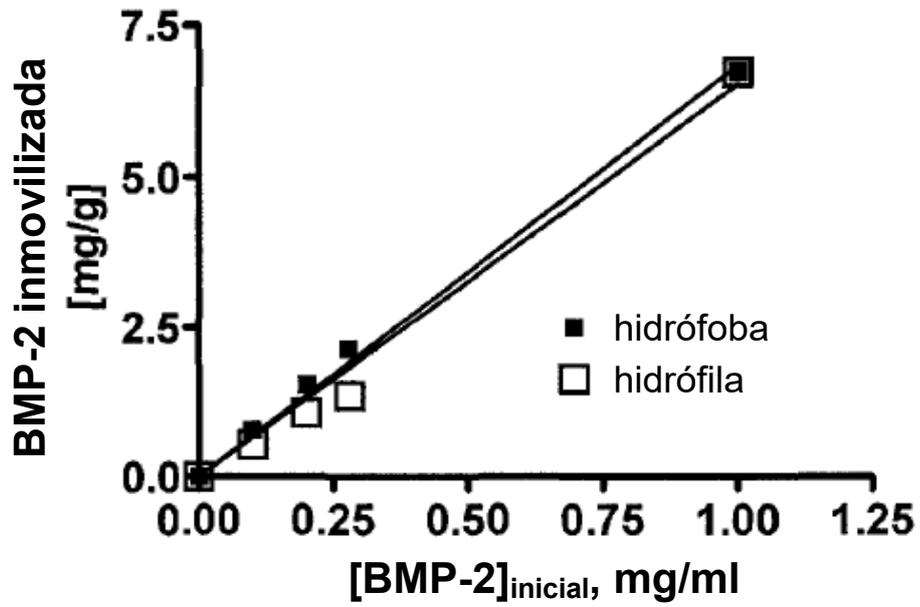


D.



**Fig. 3**

**A.**



**B.**

