

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 202**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/44** (2006.01)

**A61L 27/46** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2014 PCT/EP2014/001966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007393**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014 E 14741205 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 3021883**

54 Título: **Material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético**

30 Prioridad:

**19.07.2013 EP 13003647**

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

**05.05.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BUFLER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 611 202 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético

5 La invención se refiere a un nuevo material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético que comprende una estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso e hidroxiapatita, en el que las fibras de colágeno están al menos parcialmente cubiertas con cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocrystalina, a un proceso para la preparación de ese material y al uso de los mismos como implante para ayudar en la formación de hueso, la regeneración ósea, la reparación ósea y/o la sustitución del hueso en un sitio con un defecto en un sujeto humano o un animal, o como implante para la regeneración combinada de hueso y cartílago.

10 Los defectos en la estructura ósea surgen en una variedad de circunstancias, tales como traumatismo, enfermedad, y cirugía y todavía hay una necesidad de una reparación eficaz de defectos óseos en varios campos quirúrgicos. Para estimular la curación en el sitio de un defecto óseo se han utilizado numerosos materiales naturales y sintéticos y composiciones.

15 Un material natural y osteoconductor sustituto de hueso bien conocido que promueve el crecimiento óseo en defectos óseos periodontales y maxilofaciales o defectos óseos en el campo de la ortopedia es el Geistlich Bio-Oss® o Geistlich Orthoss, respectivamente, disponible en el mercado en Geistlich Pharma AG. Ese material mineral óseo a base de hidroxiapatita se fabrica a partir de hueso natural por un proceso descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.167.961, que permite la conservación de la arquitectura trabecular y la estructura nanocrystalina del hueso natural.

20 Sin embargo, los materiales a base de hidroxiapatita no siempre están adaptados para la reparación de defectos de huesos largos, en particular en ortopedia, al ser frágiles y no suficientemente resistentes a esfuerzos mecánicos como para poder atornillarse, por ejemplo, a una parte del cuerpo óseo.

25 Por tanto, existe una necesidad de un material de injerto óseo sintético o parcialmente sintético hecho para asemejarse estrechamente al hueso natural, en particular en su resistencia a tensiones mecánicas. Un material de injerto de hueso sintético o parcialmente sintético biomimético sería un sustituto de injertos óseos derivados de hueso natural útil para ciertas aplicaciones, en particular para la reparación de defectos de huesos largos.

30 El hueso natural es un material compuesto que consiste en agua y una matriz de colágeno que consta principalmente de colágeno de tipo I, que está íntimamente combinado con cristales inorgánicos, principalmente de hidroxiapatita. Las fibras de colágeno tipo I y la hidroxiapatita suponen aproximadamente del 25 al 30 % en p/p y del 65 al 70 % en p/p del peso seco de hueso natural, respectivamente. La matriz de colágeno proporciona su flexibilidad y capacidad de recuperación al hueso, mientras que el material inorgánico le proporciona al hueso su fuerza y rigidez, con la organización de las dos fases que proporciona un alto grado de elasticidad y resistencia del material compuesto. Se ha presentado un examen minucioso de la estructura ósea a nivel de angstrom (cristal mineral) a nivel de micras (laminillas) por Weiner, S. et al., 1992, FASEB, 6: 879-885.

35 Una característica importante del hueso natural es la morfología y el tamaño muy pequeño de los cristales de hidroxiapatita, que para el mineral óseo humano es: grupo espacial hexagonal  $P6_3/m$ , aproximadamente de 30 a 50 nm de longitud (eje c: [0,0,1]) y de 14 a 25 nm en los (ejes a y b: [1,0,0] y [0,1,0]). Véase Weiner S. et al., citada anteriormente.

40 N.A. Barrios et al. en "Density Functional Study of Binding of Glycine, Proline and Hydroxyproline to the Hydroxyapatite (0001) and (0110) Surfaces", 2009, Langmuir 25(9), 5018-5025 y "Molecular Dynamics Simulation of the Early Stages of Nucleation of Hydroxyapatite at a Collagen Template", Crystal Growth Design, 2012, 12, 756-763, muestran que, a la temperatura del cuerpo humano, la nucleación y el acoplamiento de la hidroxiapatita a las fibras de colágeno pueden tener lugar en diferentes sitios de los bloques de construcción del colágeno, los aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, es decir, sobre la superficie del cristal (0001) y (0110), siendo preferido el acoplamiento sobre la superficie del cristal (0110). Esto demuestra que en el cuerpo humano la estructura de la fibra de colágeno y sus bloques de construcción de aminoácidos proporciona un sustrato que corresponde exactamente a la estructura cristalina de la hidroxiapatita, por lo tanto la formación de hueso sigue una vía de crecimiento epitáctico para interconectar los cristales de hidroxiapatita y las fibras de colágeno. La vía de crecimiento epitáctico está favorecida termodinámicamente dando la configuración de energía más baja.

45 Se han hecho intentos en la técnica anterior para proporcionar materiales compuestos de colágeno-hidroxiapatita que sean similares al hueso natural.

50 La patente de Estados Unidos n.º 5.231.169 describe un método de mineralización del colágeno con un mineral de fosfato de calcio que comprende la preparación de dicho mineral de fosfato de calcio en presencia de una dispersión de fibrillas de colágeno dispersadas en solución acuosa básica que tiene un pH en el intervalo de 10 a 13, añadiendo a dicha dispersión durante un período de al menos una hora una fuente de calcio soluble y el fosfato soluble en la proporción correcta, tal como para producir dicho mineral de fosfato, y recogiendo el colágeno

mineralizado. Se enseña que así se obtiene colágeno mineralizado con fosfato de calcio distribuido de forma estable en la matriz de colágeno.

5 La patente de Estados Unidos n.º 5.739.286 desvela un método de fabricación de un material de aumento óseo que se asemeja al hueso natural por mineralización de fibras de colágeno durante un periodo de 7 días en una cámara de difusión doble, un depósito que contiene tampón Tris 0,05 M y cloruro de calcio 0,1 M y el otro depósito que contiene tampón de Tris 0,05 M y fosfato de potasio 0,1 M. Se enseña que se forma un precipitado de fosfato de calcio sobre las fibras de colágeno, con las microfotografías electrónicas de barrido de las fibras de colágeno mineralizadas que son morfológicamente similares a los agregados de tipo placa de hidroxiapatita que se encuentran precipitados sobre materiales de biovidrio empapados en plasma sanguíneo sintético.

15 Las patentes de Estados Unidos n.º 6.395.036 y 6.589.590 describen un método de fabricación de hueso artificial, proporcionando una membrana de colágeno con soluciones de iones de calcio y de iones fosfato en lados opuestos de la membrana, los iones que se difunden a través de la membrana, se reúnen y precipitan como material de hidroxiapatita en el interior de la membrana de colágeno.

20 Las patentes de Estados Unidos n.º 7.514.249 y 7.547.449 describen un método de fabricación de una esponja de colágeno biomimético mineralizada con fosfato de calcio, en la que el fosfato de calcio se incorpora en los espacios intersticiales de las fibrillas de colágeno, usando una solución de cloruro de calcio 6 mM y 200 µg/ml tanto de poli (ácido alfa-beta-DL-aspartico) como de poli (ácido vinilfosfónico), seguido de la difusión del vapor de fosfato dibásico de amonio.

25 Fikai A. et al., 2010, Chemical Engineering 160, 794-800 desvela un proceso de preparación de un material compuesto de colágeno-apatita a partir de un gel de colágeno y precursores de hidroxiapatita en el que el pH se ajusta a aproximadamente 9 usando una solución de hidróxido de sodio para así asegurar la precipitación de la hidroxiapatita y la fibrillogénesis. De este modo, los cristales de hidroxiapatita se forman "en el intervalo nanométrico, entre unos pocos nanómetros y hasta 40 nm". Puesto que la nucleación de la hidroxiapatita tiene lugar durante la fibrillogénesis, durante la cual el auto-ensamblaje de las moléculas de colágeno modifica las posiciones de los bloques de construcción de aminoácidos del colágeno (que por lo tanto no se corresponden exactamente con la estructura cristalina de la hidroxiapatita), no puede haber ningún crecimiento epitáctico de los cristales de hidroxiapatita: Esos cristales se precipitan como se indica en dicha publicación.

35 La publicación de patente Estados Unidos 2009/0232875 describe una estructura multicapa que comprende una primera capa superior que consiste en una matriz orgánica que contiene colágeno y al menos una capa inferior de una matriz compuesta que contiene hidroxiapatita y colágeno (párrafo [0001]). El material compuesto se obtiene por un proceso de nucleación directa de hidroxiapatita en fibrillas de colágeno de auto-ensamblaje a un pH de 9 a 11 y una temperatura de 35-40 °C, con los tamaños de los cristales que son de 12 a 15 nm a lo largo de eje de la fibra (párrafos [0082] y [0089]). Puesto que, como en Fikai et al. anteriormente, la nucleación de la hidroxiapatita tiene lugar durante el auto-ensamblaje de las moléculas de colágeno (esto último que modifica las posiciones de los bloques de construcción de aminoácidos del colágeno) y además esta nucleación "supone una carbonatación de la fase inorgánica, es decir la incorporación de grupos  $\text{CO}_3^{2-}$  en la red de hidroxiapatita" (véase el párrafo [0077], líneas 25-28), la hidroxiapatita carbonatada que tiene una estructura cristalina diferente (estructura cristalina monoclinica con grupo espacial P2<sub>1</sub>/b: véase Elliot J.C. 1994: Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Phosphates. Studies in inorganic Chemistry 18. Elsevier Science, ISBN 0-444-81582-1), no puede haber ningún crecimiento epitáctico de los cristales de hidroxiapatita: Esos cristales por lo tanto crecen por precipitación sobre los "nano-núcleos formados dentro de las fibrillas de colágeno... paralelos a las fibrillas" (véase el párrafo [0090]).

50 El documento US-2010/0021552 desvela un implante de biomaterial que incluye una estructura de fibrillas mineralizadas, en el que "los huecos a escala nanométrica dentro de la fibrilla de colágeno nativa auto-ensamblada limita el tamaño al cual las mineralitas pueden crecer fácilmente y atrapa las mineralitas de modo que no se difunden fuera de las fibrillas de colágeno", las únicas mineralitas apáticas que se mencionan tienen como máximo aproximadamente 1 nm X 10 nm X 10 nm ([0044], [0045], [0105], [0113]).

55 En los materiales compuestos de colágeno-hidroxiapatita de la técnica anterior, la hidroxiapatita se precipita sobre o dentro de la estructura de colágeno, la unión con este último que es solo una unión física débil, como por adsorción. Una unión física débil de este tipo no es capaz de dotar al material con la elasticidad, la resistencia a la torsión y la resistencia del hueso natural con la que los cristales de hidroxiapatita se cultivan epitácticamente sobre las fibras de colágeno.

60 Un objetivo de la invención, por tanto, es proporcionar un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético en el que existe una unión fuerte entre la estructura de colágeno y los cristales de hidroxiapatita.

65 En los materiales compuestos de colágeno-hidroxiapatita de la técnica anterior los cristales de hidroxiapatita no tienen la morfología (relación de cara del cristal y parámetros de red) y el tamaño muy pequeño del mineral óseo natural, en particular del mineral óseo humano.

Otro objetivo de la invención, por tanto, es proporcionar un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético en el que los cristales de colágeno tienen la misma morfología y el mismo tamaño que el mineral óseo humano.

5 La patente europea n.º 2.445.543 enseña las condiciones en que los nanocristales de hidroxiapatita crecen epitácticamente en un núcleo de  $\alpha$ -TCP sinterizado, los nanocristales que tienen la misma morfología y el mismo tamaño que el mineral óseo humano.

10 Se ha encontrado que los objetivos anteriores se pueden alcanzar mediante la adaptación de las condiciones descritas en la patente europea n.º 2.445.543 para crecer epitácticamente nanocristales de hidroxiapatita sobre las fibras de colágeno, los nanocristales que tienen la misma morfología y el mismo tamaño que el mineral óseo humano.

15 De este modo se obtiene un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético con excelentes propiedades mecánicas, en particular una alta resistencia a la tensión mecánica, en particular una alta resistencia al par de torsión (al menos 30 Ncm, en general aproximadamente 60 Ncm), gracias a la fuerte unión epitáctica entre la estructura de colágeno y los cristales de hidroxiapatita. Este material después de la implantación en un cuerpo humano es colonizado fácilmente por las células formadoras de hueso y muestra propiedades de osteoconductividad y osteointegración excelentes gracias en particular a que los cristales de hidroxiapatita tienen la misma morfología y  
20 el mismo tamaño que el mineral óseo humano.

Los objetivos anteriores se consiguen mediante la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

25 La invención por lo tanto se refiere a un nuevo material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético que comprende una estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso que incluye fibras maduras nativas de colágeno que poseen triple helicidad como se muestra por espectroscopía de dicroísmo circular, en el que dichas fibras maduras nativas de colágeno están al menos parcialmente cubiertas con cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocrystalina, en el que los nanocristales cultivados epitácticamente tienen la misma morfología que el mineral óseo humano y son del mismo tamaño que el mineral óseo humano, es decir, de una longitud de 30 a  
30 50 nm y una anchura de 14 a 25 nm.

35 El término "la misma morfología que el mineral óseo humano" significa que la relación dimensional de las caras del cristal (que determina las formas externas de los cristales) es la misma que en el mineral óseo humano. En este último los cristales generalmente son plaquetas hexagonales.

40 El crecimiento epitáctico de la hidroxiapatita sobre el colágeno solo puede tener lugar en las fibras de colágeno, como se muestra por las publicaciones de N.A. Barrios et al., antes citadas. Estas fibras deben ser fibras maduras nativas de colágeno, es decir, fibras de colágeno en las que (a) las fibrillas se han ensamblado por autoensamblaje de los bloques de construcción de colágeno, (b) se han formado las cadenas alfa 1 y alfa 2 y (c) se ha formado la triple hélice por reticulación natural de dos cadenas alfa 1 con una cadena alfa 2. Dichas fibras maduras nativas de colágeno poseen triple helicidad como se muestra mediante espectroscopía de dicroísmo circular. En las fibras maduras nativas de colágeno las respectivas posiciones de los bloques de construcción del colágeno, glicina, prolina e hidroxiprolina, son fijos, que corresponde exactamente a la estructura de la hidroxiapatita, lo que permite la interconexión epitáctica entre la hidroxiapatita y las fibras maduras nativas de colágeno. Las fibras en formación en  
45 las que las fibrillas se autoensamblan, las cadenas alfa 1 y alfa 2 se están formando o la triple hélice se está formando, no son apropiadas para el crecimiento epitáctico de hidroxiapatita. En efecto, en dichas fibras en formación, las posiciones de los bloques de construcción del colágeno cambian, por lo que no se corresponden exactamente con la estructura cristalina de la hidroxiapatita.

50 Por tanto, es necesario que la estructura de colágeno sea al menos parcialmente fibroso en su superficie externa e incluya fibras maduras nativas de colágeno que posean triple helicidad como se muestra por espectroscopía de dicroísmo circular.

55 La estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso generalmente comprende en su superficie externa al menos el 2 % de fibras maduras nativas de colágeno, preferentemente al menos el 5 % de fibras maduras nativas de colágeno, más preferentemente al menos el 10 % de fibras maduras nativas de colágeno, según lo determinado por análisis de imagen en microfotografías de MEB y espectroscopía de dicroísmo circular.

60 La estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso generalmente está compuesta de colágeno de tipo I, pero también puede incluir otros tipos de colágeno, en particular colágeno de tipo II y de tipo III.

65 La estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso generalmente es una matriz de colágeno derivado de un material natural o una matriz de colágeno semi-artificial o artificial, por ejemplo, preparada por electrohilado de una suspensión de partículas de colágeno o una solución de colágeno soluble, el colágeno que procede de un material natural o que es colágeno recombinante.

Los cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina generalmente forman una capa que tiene un espesor de al menos  $30 \pm 15$  nm, determinado por análisis de difracción de rayos X. El espesor de al menos  $30 \pm 15$  nm corresponde a una capa de nanocristales de hidroxiapatita en orientación epitaxial.

5 La capa crecida epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina puede comprender una o varias capas de nanocristales de hidroxiapatita en orientación epitaxial al sustrato fibras de colágeno. El espesor de la capa crecida epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina, que está relacionado con el número de dichas capas de nanocristales de hidroxiapatita en orientación epitaxial, se seleccionará de acuerdo con la aplicación prevista del material de sustitución ósea como implante en el cuerpo humano.

10 El espesor de la capa crecida epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina está relacionado con la relación en p/p de la estructura de colágeno fibroso a los cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina, dicha relación que generalmente está entre 5:95 y 95:5, preferentemente entre 10:90 y 90:10, más preferentemente entre 20:80 y 60:40, en particular entre 30:70 y 70:30.

15 El material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético puede ser un material particulado o un granulado, las partículas o gránulos que tienen un tamaño y forma deseados. Generalmente las partículas o gránulos son aproximadamente esféricos y tienen un diámetro de 20 a 5000  $\mu\text{m}$ .

20 El material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético también puede ser un cuerpo conformado con cualquier forma, por ejemplo, un bloque cúbico o paralelepípedo, una placa, un cilindro, una llave cónica, un clavo, un tornillo, un perno o una estructura que tiene el perfil de una parte del cuerpo óseo tal como, especialmente, una cadera, una clavícula, una costilla, una mandíbula o una parte del cráneo. Un cuerpo conformado de este tipo puede tener una resistencia a la torsión suficiente para poderse atornillar, por ejemplo, a una parte del cuerpo óseo, es decir, una resistencia a la torsión de al menos 30 Ncm, en estado seco, preferentemente una resistencia a la torsión de al menos 50 Ncm, en estado seco.

El material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético también puede ser un cuerpo con forma de membrana.

30 Una estructura de colágeno adecuado para un cuerpo en forma de membrana es la membrana Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Suiza) fabricada de acuerdo con el proceso descrito en la patente EP-B1-1676592, que tiene un lado fibroso que permite el crecimiento hacia el interior de células formadoras de hueso y un lado liso que actúa como barrera contra el crecimiento hacia el interior de las células no formadoras de hueso. Dicha membrana generalmente está recubierta solo sobre la parte fibrosa con nanocristales de hidroxiapatita cultivados epitácticamente, proporcionando de ese modo sobre ese lado condiciones muy favorables para la formación de hueso.

35 El material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético de la invención se puede utilizar como implante o prótesis para la formación de hueso, la regeneración ósea, la reparación ósea y/o la sustitución de hueso en un sitio con un defecto óseo, en particular sitio con un defecto de un hueso grande, en un sujeto humano o un animal.

La invención también se refiere a:

- 45
- el uso de ese material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético como implante o prótesis para la formación de hueso, la regeneración ósea, la reparación ósea y/o la sustitución del hueso en un sitio con un defecto en un sujeto humano o un animal y
  - un método para promover la formación de hueso, la regeneración ósea y/o la reparación ósea en un sitio con un defecto en un sujeto humano o un animal mediante la implantación de un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético.

50 Se puede usar un cuerpo en forma de membrana de material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético de la invención en el que solo se reviste un lado con nanocristales de hidroxiapatita cultivados epitácticamente como implante para la regeneración combinada de hueso y cartílago, el lado revestido que está orientado de tal manera que está frente al defecto del hueso y el lado no recubierto que está orientado de tal manera que está frente al defecto del cartílago.

La invención por tanto también se refiere al uso de un cuerpo en forma de membrana de material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético como implante para la regeneración combinada de hueso y cartílago.

60 La invención se refiere además a un proceso para preparar el material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético definido anteriormente que comprende las etapas de:

- 65
- a) sumergir una estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso que incluye fibras maduras nativas de colágeno que poseen triple helicidad como se muestra por espectroscopía de dicroísmo circular en una solución acuosa saturada de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$  saturado para llevar a cabo el proceso de formación del material de implante compuesto, mediante el cual se forman nanocristales de hidroxiapatita cultivados epitácticamente sobre las fibras

maduras nativas de colágeno, los nanocristales cultivados epitácticamente que tienen la misma morfología y el mismo tamaño que el mineral óseo humano,

b) detener la formación de nanocristales de hidroxiapatita cultivados epitácticamente mediante la separación del material sólido de la solución acuosa, el lavado con agua y el secado, y

5 c) opcionalmente esterilizar el material seco separado procedente de la etapa b).

La estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso generalmente es una matriz de colágeno derivado de un material natural o una matriz de colágeno semi-artificial o artificial, que tiene una pre-forma compatible con la forma final deseada para el material compuesto biomimético y un grado de reticulación suficiente para las propiedades mecánicas deseadas del material compuesto biomimético. Si es necesario, la preparación de dicha estructura de colágeno incluirá una etapa para darle la pre-forma deseada y una etapa de reticulación para darle una cohesión y una resistencia suficientes.

15 Antes de realizar la etapa a) la estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso generalmente se limpia en un alcohol tal como por ejemplo etanol e isopropanol y un éter tal como por ejemplo éter dietílico.

La solución acuosa saturada de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$  saturada puede ser una solución de tampón fosfato (PBS) que contiene alfa-TCP, beta-TCP, TTCP, pentahidrato de fosfato de octacalcio, fosfato dicálcico o fosfato dicálcico dihidrato finamente dispersos. Dicha dispersión de un fosfato de calcio en una solución de PBS permite que la solución permanezca saturada en  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$  cuando los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$  se consumen para formar hidroxiapatita.

La solución acuosa saturada de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$  saturada también puede ser una solución de tampón fosfato a la que se añaden iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$  para compensar su consumo en la formación de hidroxiapatita, por ejemplo, por goteo de una solución que contiene dichos iones en el medio de reacción.

La solución de tampón fosfato generalmente tiene una concentración de 0,1 a 1,0 M, en particular de 0,2 a 0,8 M.

30 El pH de la solución acuosa saturada de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$  saturada generalmente permanece durante la etapa a) dentro de un intervalo de 5,5 a 9,0, preferentemente de 6,5 a 8,0.

La etapa a) generalmente se lleva a cabo a temperatura entre 25 y 45 °C, preferentemente entre 35 °C y 42 °C.

35 La etapa a) se lleva a cabo durante un tiempo suficiente como para permitir el crecimiento epitáctico de cantidades sustanciales de cristales de hidroxiapatita sobre las fibras maduras nativas de colágeno. El crecimiento epitáctico en efecto está favorecido termodinámicamente dando la configuración de energía más baja, pero se necesita tiempo para que se establezca. En general, un tiempo suficiente es al menos aproximadamente 12 horas, preferentemente al menos aproximadamente 24 horas.

40 Esas condiciones de la etapa a), cerca de las condiciones de formación de hueso en el cuerpo humano, permiten el crecimiento epitáctico sobre fibras de colágeno de nanocristales de hidroxiapatita que tienen la misma morfología y tamaño que el mineral óseo humano.

45 La etapa a) generalmente se lleva a cabo durante un tiempo al menos suficiente para que sobre las fibras maduras nativas de colágeno esté presente un recubrimiento cerrado de al menos una capa nanocristalina de hidroxiapatita: Ese tiempo se selecciona de acuerdo con las propiedades deseadas para el material de colágeno-hidroxiapatita biomimético, en particular, el número deseado de capas nanocristalinas y la relación en p/p de la estructura de colágeno a las capas cultivadas epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina.

50 En la etapa b) la formación de nanocristales de hidroxiapatita cultivados epitácticamente se detiene mediante la separación del material sólido de la solución acuosa, el lavado con agua y el secado.

En general, se lleva a cabo una etapa c) opcional adicional de esterilización del material seco separado procedente de la etapa b).

55 Ventajas del material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético de la invención

60 Gracias a la fuerte unión epitáctica, como en el hueso natural, entre la estructura de colágeno y los nanocristales de hidroxiapatita, el material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético sintético o parcialmente sintético de la invención tiene excelentes propiedades mecánicas, en particular una alta resistencia a la tensión mecánica, en particular una alta resistencia a la torsión (al menos 30 Ncm, generalmente aproximadamente 60 Ncm), una alta resistencia a la compresión y una alta capacidad de recuperación. Gracias a estas excelentes propiedades mecánicas, los cuerpos moldeados de material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético de la invención son atornillables, especialmente en partes del cuerpo óseos, y también mantienen permanentemente el volumen bajo tensión mecánica: Por lo tanto están adaptados idealmente para la reparación de defectos de huesos largos.

El material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético de la invención es colonizado fácilmente por células formadoras de hueso con un bajo nivel de citotoxicidad (véase el ejemplo 4 d) a continuación) y muestra excelentes propiedades de osteoconductividad y osteointegración en el cuerpo humano, en particular gracias al hecho de que los nanocristales de hidroxiapatita tienen la misma morfología y el mismo tamaño que el mineral óseo humano, como se muestra por siguiente tabla 1:

Tabla 1

Comparación del tamaño y la morfología de cristal de hidroxiapatita para el material compuesto de implante biomimético de la invención y mineral óseo humano		
Ejes cristalográficos (grupo espacial hexagonal P6 <sub>3</sub> /m)	Material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético de la invención preparado a pH y temperatura fisiológica. Tamaño del cristal <sup>+</sup> [nm]	Mineral óseo humano natural Tamaño del cristal <sup>+</sup> [nm]
a (1,0,0)	18 (± 4)	14-25
b (0,1,0)	18 (± 4)	14-25
c (0,0,1)	38 (± 8)	30-50

El análisis del tamaño de cristal se ha realizado usando TEM (microscopía electrónica de transmisión), así como el refinamiento de los datos de difracción de rayos X mediante el método de Bragg y la técnica de Warren-Averbach.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance. La siguiente descripción se comprenderá mejor haciendo referencia a:

- La Figura 1 que representa una microfotografía MEB de la parte fibrosa de la estructura de colágeno en forma de membrana del Ejemplo 1c), recubierta como se describe en el Ejemplo 3 b) con una concentración de PBS 0,2 M durante un tiempo de reacción del recubrimiento de 12 horas,
- La Figura 2 que representa una microfotografía MEB de la parte fibrosa de la estructura de colágeno en forma de membrana del Ejemplo 1c), recubierta como se describe en el Ejemplo 3 b) con una concentración de PBS 0,8 M durante un tiempo de reacción del recubrimiento de 24 horas, y
- La Figura 3 que representa una microfotografía MEB de la parte fibrosa de la estructura en forma de membrana de colágeno del Ejemplo 1c), recubierta como se describe en el Ejemplo 3 b), que ha sido colonizada con células similares a osteoblastos MG63.

Ejemplo 1 Preparación de una estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso

a) Preparación de una estructura de colágeno fibroso cilíndrico derivado de una preparación de Bio-Gide® de piezas cilíndricas de colágeno seco compactado

Una membrana Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Suiza) se tritura finamente usando un molino de ultracentrífuga y se tamizó en un tamiz de 2,0 mm. Se puso 0,2 g del colágeno tamizado en 5 ml del 99,9 % de etanol y la masa de colágeno se puso con unas pinzas en un pocillo de una placa de 24 pocillos y se compactó con un cilindro de Teflon de 2,0 mm de diámetro, después se extrae del pocillo con una herramienta de ajuste de 2,0 mm de diámetro y se secó durante 4 horas en una campana química. Estas operaciones se realizaron 6 veces en paralelo para así obtener 6 piezas cilíndricas de colágeno seco compactado.

Reticulación de las piezas cilíndricas de colágeno seco compactado

3,571 ml de una solución en etanol de EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida) se pipetearon en un matraz volumétrico de 100 ml y el volumen se completó hasta 100 ml con el 99,9 % de etanol, después se vertió en un matraz de extracción de 200 ml en el que se añadieron las 6 piezas de colágeno seco obtenido anteriormente. El etanol se evaporó durante 1 minuto a vacío en un desecador, y a continuación, el desecador se puso a presión atmosférica. La mezcla se reticuló con agitación a 110 rpm durante 10 minutos usando un agitador horizontal. La solución de EDC se decantó y los cilindros de colágeno se pusieron en un vaso de precipitados de 200 ml al que se añadieron 100 ml de PBS (solución de tampón fosfato) y se eliminan durante 1 minuto a vacío. Los cilindros de colágeno se limpiaron con 100 ml de PBS con agitación a 50 rpm durante 5 minutos, y el PBS se decantó sin evaporación a vacío. Este proceso se repitió 2 veces. Los cilindros de colágeno se limpiaron con 100 ml del 99,9 % de etanol con agitación a 50 rpm durante 5 minutos y el etanol se decantó sin evaporación a vacío; el proceso se repite dos veces. Los cilindros de colágeno se limpiaron con 100 ml de éter dietílico sin agitación y se secaron durante 14 horas en una campana química.

Se realizaron otros experimentos con un tiempo diferente (hasta 240 minutos) para la reacción de reticulación.

El % de fibras maduras nativas de colágeno que poseen triple helicidad (como se muestra mediante espectroscopía de dicroísmo circular) de la estructura de colágeno cilíndrica, como se determina por análisis de imagen utilizando el software Phenom Pro (FEI Phenom Pro Tabletop MEB S/N: 0342; Phenom Pro Suite V. 1.1.0.920; Phenom

Application System PW-220-001; Phenom Fribremetric PW-210-001, disponible en Phenom World, Dillenburgstraat 9E, 5652 AM, Eindhoven, Países Bajos) en microfotografías MEB (Microscopía electrónica de barrido) de 5000 aumentos, era de aproximadamente el 90 %.

5 b) Preparación de una estructura de colágeno esponjoso cilíndrico parcialmente fibroso derivada de una esponja de colágeno de tipo I y tipo II

Preparación de una esponja de colágeno:

10 Se preparó una matriz de colágeno extracelular esponjoso reabsorbible a partir de cartílago congelado de cerdos recién sacrificados por obtención de la grasa, seguido de tratamiento básico y ácido como se describe en el Ejemplo 1 de la patente EP-B1-810888. Por métodos inmunológicos se demostró que esa matriz contiene una mezcla de colágeno de tipo I y tipo II.

15 Preparación de piezas cilíndricas de colágeno esponjoso seco compactado

La matriz esponjosa se trituró finamente usando un molino de ultracentrífuga y se tamizó en un tamiz de 2,0 mm. Se puso 0,2 g del colágeno tamizado en 5 ml del 99,9 % de etanol y la masa de colágeno se puso con pinzas en un pocillo de una placa de 24 pocillos y se compacta con un cilindro de Teflon de 2,0 mm de diámetro, después se extrae del pocillo con una herramienta de ajuste de 2,0 mm de diámetro y se secó durante 4 horas en una campana química.

Entrecruzamiento de las piezas cilíndricas de colágeno esponjoso seco compactado

25 Las piezas cilíndricas de colágeno esponjoso compactado seco obtenido anteriormente se reticularon con EDC, se limpió con PBS, etanol y éter dietílico, de forma análoga al proceso descrito anteriormente en a) para la estructura de colágeno cilíndrico fibroso. El % de fibras nativas maduras que poseen triple helicidad en la estructura de colágeno esponjoso cilíndrico parcialmente fibroso, según lo determinado por el software de análisis de imagen Phenom Pro, en microfotografías de MEB de 5000 aumentos, fue de aproximadamente el 5 %.

30 c) Preparación de una estructura de colágeno fibroso en forma de membrana derivada de Bio-Gide®

Una membrana Bio-Gide® (Geistlich Pharma AG, Suiza) se limpió con 100 ml del 99,9 % de etanol con agitación a 50 rpm durante 5 minutos y el etanol se decantó sin evaporación a vacío; el proceso se repite dos veces. A continuación, la membrana de colágeno se limpió con 100 ml de éter dietílico sin agitación y se secó durante 14 horas en una campana química.

El % de fibras nativas maduras que poseen triple helicidad en la parte fibrosa, según lo determinado por el software de análisis de imagen Phenom Pro en microfotografías de MEB de 5000 aumentos, era aproximadamente del 100 %.

Ejemplo 2 Preparación de un material sinterizado grueso de  $\alpha$ -TCP

45 Para una mezcla de 500 g (peso en seco), se mezclaron 360 g de polvo de fosfato dicálcico anhidro, 144 g de polvo de carbonato de calcio y 220 ml agua desionizada durante 7 minutos a 500 rpm utilizando un agitador de laboratorio. La suspensión del proceso de mezcla se transfirió inmediatamente a una copa de platino estable a alta temperatura. La copa de platino llena se coloca en un horno frío. El horno se calentó a 1400 °C utilizando una velocidad de calentamiento de 60 °C por hora. El proceso de calentamiento se detuvo después de 72 horas desconectando el horno. La muestra se enfrió hasta temperatura ambiente dentro del horno. El material a granel sinterizado (fase pura de  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) se retiró del horno y de la copa de platino. El producto a granel del proceso de sinterizado tenía un peso de 420 g (pérdida de peso del 16,7 %).

El control de pureza de la fase se realizó mediante análisis de difracción de rayos X en polvo.

55 Ejemplo 3 Recubrimiento de una estructura de colágeno fibroso con cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocrystalina en una solución de PBS en presencia de una dispersión de partículas finas de  $\alpha$ -TCP.

60 a) Recubrimiento de las piezas cilíndricas de colágeno fibroso obtenidas en el Ejemplo 1 a) Preparación de una solución de PBS 0,5 M: se preparan 100 ml de una solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0,5 M (solución A) disolviendo 6,9 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O en agua desionizada estéril a temperatura ambiente con agitación a 250 rpm durante 30 minutos y a 600 rpm durante 4 horas. Se preparan 100 ml de una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,5 M (solución B) disolviendo 8,9 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O en agua desionizada estéril a temperatura ambiente con agitación a 250 rpm durante 30 minutos y a 600 rpm durante 4 horas. Se mezclaron 19 ml de la solución A con 81 ml de la solución B, para dar una solución de PBS 0,5 M que tiene un pH entre 7,3 y 7,4.

65

Trituración de  $\alpha$ -TCP en partículas finas: El producto a granel del Ejemplo 2 se trituró utilizando una trituradora de mandíbulas (tamaño de ranura de 4 mm) Los gránulos gruesos se tamizaron usando una máquina de tamizado e insertos de tamiz con una abertura de malla de 2 mm y 0,25 mm. Los gránulos tamizados se molieron adicionalmente utilizando un molino planetario hasta un tamaño final de menos de 10  $\mu$ m.

5 Recubrimiento de los cilindros de colágeno fibroso obtenidos en el Ejemplo 1 a) con cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina:

10 5 g de partículas finas de  $\alpha$ -TCP y 100 ml de una solución de PBS 0,5 M obtenida como se ha descrito anteriormente y los cilindros de colágeno fibroso obtenidos en el Ejemplo 1 a) se añadieron a una botella de pesaje de vidrio que se puso en un desecador a vacío durante 5 minutos, y a continuación, a presión atmosférica. La reacción del recubrimiento se llevó a cabo con agitación a 37 °C durante 3 días al poner la botella en un agitador horizontal operado a 5-50 rpm en un compartimento termostático.

15 La observación visual mostró que la estructura de colágeno retiene su forma cilíndrica pero estaba cubierta con una sustancia cristalina blanca.

Otros experimentos de recubrimiento de los cilindros de colágeno fibroso obtenidos en el Ejemplo 1 a)

20 Se realizaron otros experimentos de recubrimiento de los cilindros de colágeno fibroso obtenidos en el Ejemplo 1 en el extremo de a) variando la concentración de la solución de PBS de 0,2 M a 0,8 M y el tiempo de reacción del recubrimiento de 12 horas a 4 días. La observación visual mostró que la estructura del colágeno retiene su forma cilíndrica pero estaba cubierta con una sustancia cristalina blanca.

25 El análisis MEB mostró que el crecimiento de los cristales, así como el tamaño, la morfología y el hábito de los ensamblajes de cristal de hidroxiapatita se pueden controlar variando la concentración de la solución de PBS y el tiempo de reacción del recubrimiento. En los experimentos anteriores la relación en p/p de la estructura de colágeno fibroso a los cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina en los cilindros de colágeno fibrosos recubiertos fue de 90/10 a 30/70.

30 b) Recubrimiento de la estructura de colágeno esponjoso cilíndrico parcialmente fibroso obtenido en el Ejemplo 1) b) y la estructura de colágeno fibroso en forma de membrana obtenida en el Ejemplo 1 c) con cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina:

35 Se llevaron a cabo experimentos de recubrimiento de los cilindros de esponja de colágeno cilíndrico parcialmente fibroso obtenidos en el Ejemplo 1 b) o el recubrimiento de la parte fibrosa de la estructura de colágeno fibroso en forma de membrana del Ejemplo 1c), variando la concentración de la solución de PBS de 0,2 M a 0,8 M y el tiempo de reacción del recubrimiento de 12 horas a 4 días.

40 La observación visual mostró que la estructura de colágeno retuvo su forma pero estaba cubierta con una sustancia cristalina blanca.

45 El análisis MEB mostró que el crecimiento de los cristales, así como el tamaño, la morfología y el hábito de los ensamblajes de cristal de hidroxiapatita se pueden controlar variando la concentración de la solución de PBS y el tiempo de reacción del recubrimiento. En los experimentos anteriores la relación en p/p de la estructura de colágeno fibroso a los cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina fue de 90/10 a 30/70 para los cilindros de esponja de colágeno parcialmente fibrosos revestidos obtenidos en el Ejemplo 1b) y de 90/10 a 50/50 para la estructura de colágeno en forma de membrana recubierta.

50 Ejemplo 4 Propiedades de la estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso recubierto con cristales de hidroxiapatita nanocristalina cultivados epitácticamente

a) Propiedades físico-químicas:

55 La porosidad medida (volumen de poros) fue del 96 % en v/v para las piezas cilíndricas de colágeno fibroso obtenidas en el Ejemplo 1a) (variando las condiciones de reticulación) y del 85 al 95 % en v/v para las piezas cilíndricas recubiertas de hidroxiapatita obtenidas en el Ejemplo 3) a).

60 La superficie específica medida por porosimetría de mercurio fue de 1,5 a 2,5  $m^2/g$  para las piezas cilíndricas de colágeno fibroso obtenido en el Ejemplo 1a) (variando las condiciones de reticulación) y de 20 a 60  $m^2/g$  para las piezas cilíndricas recubiertas de hidroxiapatita obtenidas en el Ejemplo 3) a).

65 La porosidad medida (volumen de poros) era de aproximadamente el 96 % en v/v para la estructura cilíndrica de esponja de colágeno preparada en el Ejemplo 1 b) y del 88 al 92 % para los cilindros de esponja de colágeno recubierta de hidroxiapatita obtenidos en el Ejemplo 3 b). La superficie específica medida por porosimetría de mercurio fue de 2  $m^2/g$  para la estructura cilíndrica de esponja de colágeno preparada en el Ejemplo 1 b) y de 25 a

50 m<sup>2</sup>/g para los cilindros de esponja de colágeno revestidos obtenidos en el Ejemplo 3 b).

b) Propiedades mecánicas:

5 b1) Resistencia a la compresión

La resistencia a la compresión (resistencia a la presión), es decir, la presión máxima que se aplicará para una compresión de los cilindros del 50 % de su altura original, se midió utilizando una máquina de ensayo de compresión mecánica (Proline Z010 fabricada por Zwick/Roell).

10 La resistencia a la compresión medida en estado húmedo fue de 0,3 a 0,7 MPa para las piezas cilíndricas de colágeno fibroso obtenidas en el Ejemplo 1a) (variando las condiciones de reticulación) y de 1,1 a 3,5 MPa para las piezas cilíndricas recubiertas de hidroxiapatita obtenidas en el Ejemplo 3) a), la resistencia a la compresión aumenta con el % de hidroxiapatita presente en las piezas cilíndricas recubiertas de hidroxiapatita.

15 b2) Resiliencia

La capacidad de recuperación, es decir, el % de la altura original, recuperada después de la compresión al 50 % de su altura original, se midió utilizando una máquina de ensayo de compresión mecánica (Proline Z010 fabricada por Zwick/Roell).

20 La resistencia medida en el estado húmedo fue del 95 al 99 % para las piezas cilíndricas de colágeno fibroso obtenidas en el Ejemplo 1a) (variando las condiciones de reticulación) y del 92 al 100 % de las piezas cilíndricas con recubrimiento de hidroxiapatita obtenidas en el Ejemplo 3) a), el % de hidroxiapatita presente en esas piezas recubiertas de hidroxiapatita que parece no influir en la capacidad de recuperación.

b3) Resistencia a la torsión

30 Se utilizó un protocolo similar al Método de fijación de bloque óseo Straumann® (cf. <http://www.straumann.ch/ch-index/products/products-biologics/products-bone-block-fixation.htm>).

35 En resumen, usando un perforador para hacer un agujero de 0,9 mm en un cilindro de Teflon (que tiene propiedades mecánicas comparables a las del hueso maxilar inferior de cerdo) y en algunas de las piezas cilíndricas secas de colágeno fibroso obtenido en el Ejemplo 1a) (variando las condiciones de reticulación) y algunas de las piezas cilíndricas recubiertas de hidroxiapatita seca obtenidas en el Ejemplo 3) a), 2, y un destornillador magnético (Klinge FTI Mikro Schr Kreuzschl, Ref. 75.23.19 disponible en Medicon) que comprende un tornillo de 1,5 x 12 mm, se midió el par máximo al que se pueden atornillar las piezas cilíndricas al cilindro de Teflon sin romperse.

40 Todas las piezas cilíndricas sin recubrimiento analizadas de colágeno fibroso obtenido en el Ejemplo 1a mostraron una resistencia a la torsión de 20 Ncm, mientras que todas las piezas cilíndricas recubiertas de hidroxiapatita analizadas obtenidas en el Ejemplo 3) a) mostraron una resistencia al par de torsión de más de aproximadamente 60 Ncm, el % de hidroxiapatita presente en esas piezas recubiertas de hidroxiapatita que no parece influir en la resistencia a la torsión. Una resistencia a la torsión de aproximadamente 30 Ncm generalmente en la técnica se considera suficiente para atornillar una pieza a una parte del cuerpo óseo.

45 El aumento drástico en la resistencia al par se debió a la fuerte unión epitáctica entre la hidroxiapatita y la estructura de colágeno.

50 De hecho, en experimentos comparativos realizados sobre las estructuras de colágeno reticulado donde de acuerdo con las condiciones de la hidroxiapatita de la técnica anterior se precipitaba sobre o dentro de la estructura de colágeno y por tanto estaban débilmente unidas a este último por adsorción, la resistencia a la torsión no aumentó significativamente.

c) Morfología del ensamblaje de cristal de hidroxiapatita como se determina por MEB

55 Las Figuras 1 y 2 representan microfotografías de MEB de la parte fibrosa de la estructura de colágeno en forma de membrana del Ejemplo 1c) recubierta como se describe en el Ejemplo 3 b) con una concentración de PBS de 0,2 M para un tiempo de reacción del recubrimiento de 12 horas y colágeno 0,8 M para un tiempo de recubrimiento de 24 horas.

60 En la Figura 1 se pueden observar pequeños ensamblajes de cristales de hidroxiapatita de plaquetas de cristal de tamaño nanométrico finamente distribuidas con simetría hexagonal estrechamente interconectadas a fibrillas de colágeno y en la Figura 2 pequeños agregados similares a rosetas de tamaño micrométrico de los ensamblajes de cristales de hidroxiapatita hexagonales que cubre por completo la estructura de las fibras de colágeno.

65

d) Ensayos de colonización de células formadoras de hueso

5 Se mostró que las células MG63 similares a osteoblastos humanos colonizan con una alta tasa de proliferación todos los sitios de la estructura de colágeno en forma de membrana recubierta obtenida en el Ejemplo 3 b). Véase la Figura 3.

10 En ensayos de citotoxicidad, la estructura de colágeno en forma de membrana recubierta obtenida en el Ejemplo 3 b) mostró resultados comparables a los obtenidos con la membrana Bio-Gide®.

## REIVINDICACIONES

1. Material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético que comprende una estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso que incluye fibras maduras nativas de colágeno que poseen triple helicidad como se muestra por espectroscopía de dicroísmo circular, en el que dichas fibras maduras nativas de colágeno están al menos parcialmente cubiertas con cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina, con lo que los nanocristales cultivados epitácticamente tienen la misma morfología que el mineral óseo humano y son del mismo tamaño que el mineral óseo humano, es decir, una longitud de 30 a 50 nm y una anchura de 14 a 25 nm y en el que los cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina forman una capa que tiene un espesor de al menos  $30 \pm 15$  nm, determinado por análisis de difracción de rayos X.
2. Un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético según la reivindicación 1, en el que la estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso comprende en su superficie externa al menos el 2 % de fibras maduras nativas de colágeno como se determina por análisis de imagen en microfotografías de MEB y espectroscopía de dicroísmo circular.
3. Un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético según la reivindicación 1, en el que la estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso comprende en su superficie externa al menos el 10 % de fibras maduras nativas de colágeno como se determina por análisis de imagen en microfotografías de MEB y espectroscopía de dicroísmo circular.
4. Un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la relación en p/p de la estructura de colágeno fibroso a los cristales cultivados epitácticamente de hidroxiapatita nanocristalina está entre 5:95 y 95:5, preferentemente entre 10:90 y 90:10.
5. Un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un cuerpo conformado.
6. Un cuerpo conformado de la reivindicación 5 que es un material de sustitución ósea, cuya estructura tiene el perfil de una parte del cuerpo óseo.
7. Un cuerpo conformado de la reivindicación 5 o 6, que tiene una resistencia a la torsión de al menos 30 Ncm, en estado seco.
8. Un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se encuentra en forma de membrana.
9. Un proceso de preparación del material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende las etapas de
- sumergir una estructura de colágeno al menos parcialmente fibroso que incluye fibras maduras nativas de colágeno que poseen triple helicidad como se muestra por espectroscopía de dicroísmo circular en una solución acuosa saturada de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}_x\text{PO}_4^{(3-x)}$  saturada, que es una solución de tampón fosfato (PBS) que contiene alfa-TCP, beta-TCP, TTCP, pentahidrato de fosfato de octacalcio, fosfato dicálcico o fosfato dicálcico dihidratado finamente dispersos, para llevar a cabo el proceso de formación del material compuesto de implante con lo que se forman nanocristales de hidroxiapatita cultivados epitácticamente sobre aquellas fibras maduras nativas de colágeno, nanocristales de hidroxiapatita crecidos epitácticamente que tienen la misma morfología y el mismo tamaño que el mineral óseo humano,
  - detener el proceso de formación del material compuesto de implante por la separación del material sólido de la solución acuosa, el lavado con agua y el secado, y
  - opcionalmente esterilizar el material separado procedente de la etapa b).
10. Un proceso de la reivindicación 9 en el que en la etapa b) el pH de la solución acuosa se mantiene dentro de un intervalo de 5,5 a 9,0.
11. Un proceso de la reivindicación 9 en el que en la etapa b) el pH de la solución acuosa se mantiene dentro de un intervalo de 6,5 a 8,0.
12. Un proceso de la reivindicación 9 o 10 en el que la temperatura en la etapa b) se encuentra entre 25 y 45 °C.
13. Un proceso de la reivindicación 9 o 10 en el que la temperatura en la etapa b) se encuentra entre 35 °C y 42 °C.
14. Un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como implante o prótesis para la formación de hueso, la regeneración ósea, la reparación ósea y/o la sustitución del hueso en un sitio con un defecto en un sujeto humano o un animal.

15. Un material compuesto de colágeno-hidroxiapatita biomimético en forma de membrana de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso como implante para la regeneración combinada de hueso y cartílago.

FIG 1

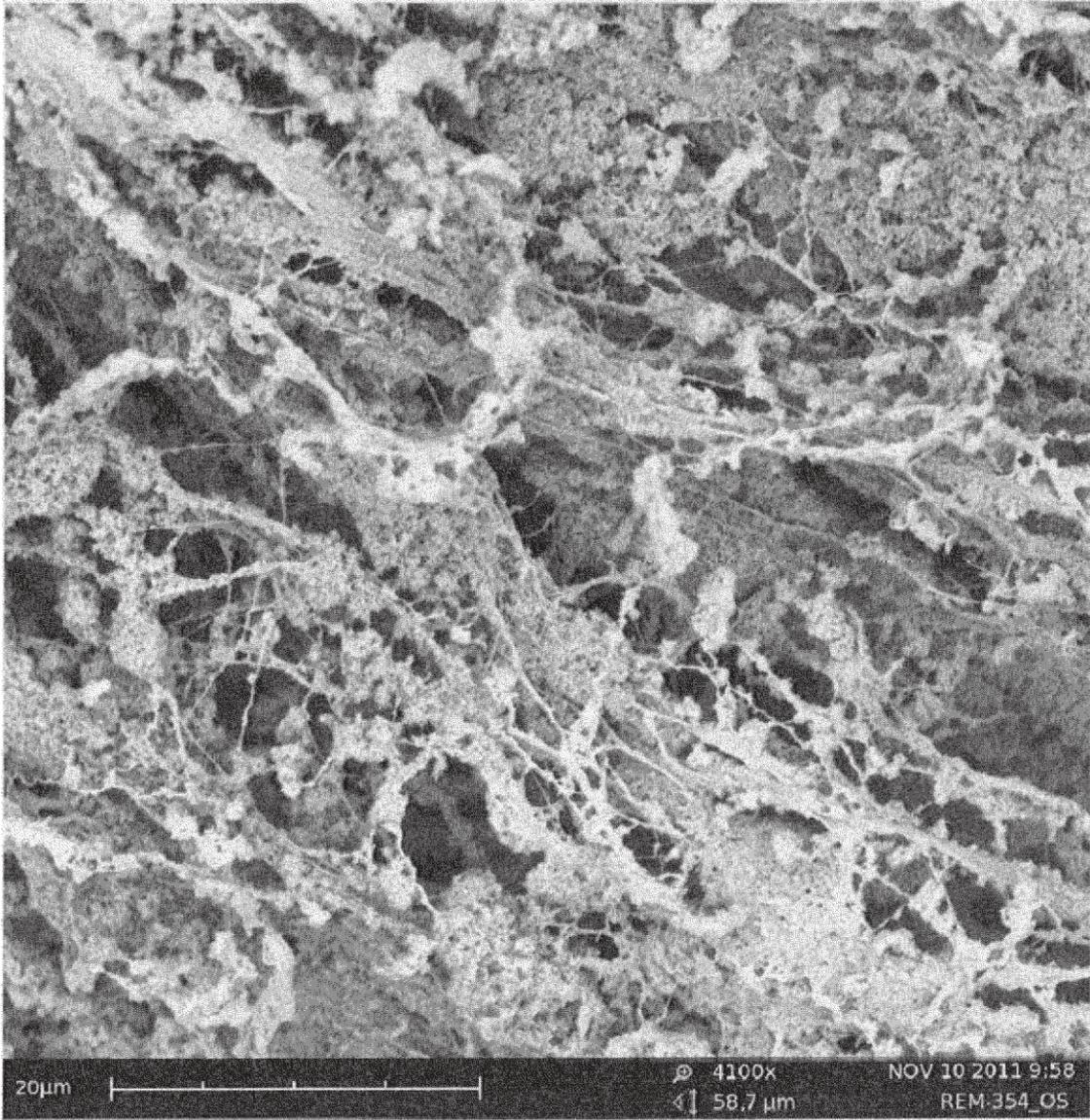


FIG 2

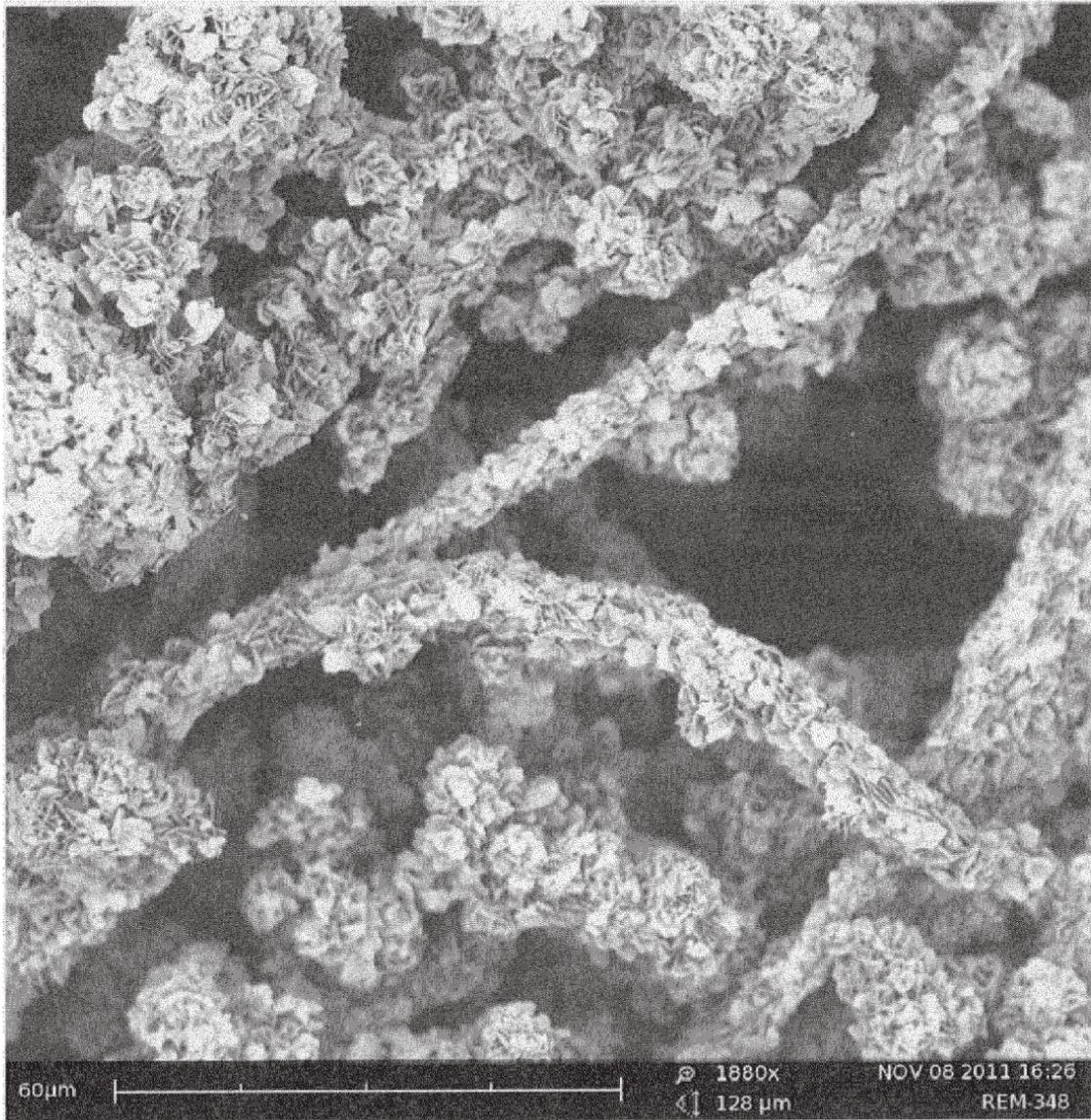


FIG 3

