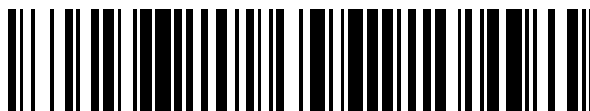


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 848**

51 Int. Cl.:

C01B 25/32 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2012 PCT/GB2012/053160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093439**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2012 E 12809843 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2794471**

54 Título: **Material de fosfato cálcico**

30 Prioridad:

23.12.2011 GB 201122405

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

27.04.2018

73 Titular/es:

**SIRAKOSS LIMITED (100.0%)
5th Floor, 125 Princes Street
Edinburgh, EH2 4AD Scotland, GB**

72 Inventor/es:

**GIBSON, IAIN, RONALD;
SKAKLE, JANET, MABEL, SCOTT y
CONWAY, JORDAN, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 665 848 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 de fosfato cálcico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a materiales de fosfato cálcico granular poroso, particularmente materiales útiles en la reparación del tejido corporal, principalmente la reparación ósea y el reemplazamiento óseo y también al uso de dichos materiales y a un método para fabricar dichos materiales.

10

Antecedentes de la invención

Debido a una enfermedad o un traumatismo, los cirujanos necesitan reemplazar el tejido óseo. Pueden usar injertos óseos (autoinjertos o aloinjertos) o materiales sintéticos para reemplazar el hueso durante la cirugía. Entre los tipos de materiales sintéticos usados para reemplazar el hueso, los cirujanos usan metales (por ejemplo, implantes de cadera o de rodilla de acero inoxidable), polímeros (por ejemplo, polietileno en copas acetabulares), cerámica (por ejemplo, hidroxiapatita como un injerto óseo macroporoso) o compuestos inorgánicos-orgánicos (por ejemplo, compuestos de hidroxiapatita-ácido poli(láctico) para placas de fijación).

15

20

25

30

35

40

La cerámica de fosfato cálcico, tales como la hidroxiapatita o el fosfato tricálcico, que se utilizan como materiales de injerto óseo se producen normalmente formando una estructura macroporosa, similar a aquella del hueso esponjoso. Dichos injertos óseos tienen normalmente grandes valores de porosidad total (60-90 %) existiendo la porosidad como una mezcla de macroporos (0,1 a 1 mm de tamaño) y microporos (0,5 a 10 μm), con los macroporos interconectados. Esta requiere habitualmente altas temperaturas de sinterizado, normalmente entre 1100-1300 $^{\circ}\text{C}$, como parte del proceso de fabricación, para densificar los fosfatos cálcicos produciendo la estructura "esponjosa" porosa. Dicho injerto óseo macroporoso, usado normalmente en forma granular, se clasifica como osteoconductor, lo que significa que actúa como un andamio y permite que el hueso crezca a lo largo de su superficie. A diferencia de los autoinjertos, la mayoría de los injertos óseos de fosfato cálcico sintéticos no son osteoinductores. La osteoinductividad es la capacidad de inducir nueva formación ósea dirigiendo las células madre del mesénquima sin diferenciar a su diferenciación y a formar hueso. Recientemente, algunos grupos han informado los desarrollos de injertos óseos sintéticos basándose en fosfatos cálcicos que son osteoinductores. El ensayo aceptado para la osteoinductividad es la implantación del material de injerto óseo en un sitio no óseo (distinto de hueso), bien subcutánea o bien intramuscularmente en un modelo animal adecuado y el uso de la histología y la histomorfometría para determinar si el hueso se forma en este sitio. Un material de injerto óseo que solamente es osteoconductor no forma hueso en este sitio, mientras que un material osteoinductor forma hueso. La ventaja de un injerto óseo osteoinductor es que, cuando se implanta en un defecto óseo en humanos, tendrá una velocidad acelerada de reparación ósea debido a que puede formarse hueso en la interfaz del implante y el hueso del hospedador por una respuesta osteoconductor y además a través del implante por una respuesta osteoinductora. Para que se forme nuevo hueso a lo largo de un injerto óseo osteoconductor se requiere un tiempo más largo después de la implantación, ya que el hueso nuevo migra a través del injerto óseo desde la interfaz del implante y el hueso del hospedador.

45

La cerámica de fosfato cálcico osteoinductor se desvela en el documento US 6.511.510, que describe cerámica de fosfato cálcico con una mezcla de macroporos con tamaños entre 0,1 y 1,5 mm y microporos con tamaños entre 0,05 y 20 μm , con una porosidad total de entre el 20 y el 90 % y un tamaño de cristal entre 50 nm y 20 μm . Esta cerámica osteoinductora se formó usando temperaturas elevadas de 1000-1275 $^{\circ}\text{C}$, preferentemente 1150-1250 $^{\circ}\text{C}$. El material cerámico se implanta como un bloque.

50

55

Un fosfato cálcico osteoinductor que consiste esencialmente en micropartículas solo con microporos se describió en el documento US 2010/0034865 (US 7.942.934), que tiene microporos con tamaños entre 0,1 y 1,5 μm , con un porcentaje en área superficial de microporos de entre el 10 y el 40 % sobre la superficie total de los gránulos y un tamaño de grano (cristal) entre 0,1 y 1,5 μm . Esta cerámica osteoinductora se formó usando temperaturas elevadas de 1050-1150 $^{\circ}\text{C}$. En esta patente, un ejemplo de gránulos que mostraron una respuesta osteoinductora cuando se implantaron en los músculos de perros que tuvieron el tamaño de microporos y de grano (cristal) más pequeños fue un fosfato tricálcico sinterizado a 1050 $^{\circ}\text{C}$; los valores se informaron como tamaño de poro de 0,58 μm y tamaño de grano de 0,76 μm , con un porcentaje en área superficial de microporos del 24,2 %.

60

65

Se describe un material sustitutivo óseo reabsorbible inorgánico con cristallitos que se mantienen holgadamente juntos en lugar de sinterizarlos juntos en el documento DE 10060036. Este material tiene una porosidad que consiste en tres escalas de tamaño diferentes, con poros en el intervalo de nanómetros, en el intervalo de unos pocos micrómetros y en la región de 100 a 1000 μm . La divulgación adicional US2007/0059379 (republicada como US 2008/0152723) menciona el material descrito en el documento DE 10060036 y combina fosfato cálcico con un xerogel de sílice para formar un material sustitutivo óseo reabsorbible inorgánico que era más fuerte que el material libre de xerogel. El xerogel de sílice tiene un tamaño de gránulo de 1 a 1000 μm y el fosfato cálcico tiene un tamaño de cristal entre 10 y 2000 nm. El xerogel tiene poros en la región de 0,5 a 20 nm, representando una porosidad de entre el 10 y el 60 %.

El documento WO 2010/079316 describe una hidroxiapatita de fosfato cálcico sustituida con silicato inorgánico, que tiene la función de liberar altos niveles de silicio a remojo en solución, para estimular la formación de nuevo hueso. La relación molar CaP está en el intervalo de 2,05 a 2,55 y la relación molar Ca/(P + Si) es menos de 1,66. El material no está sinterizado y se usa como un polvo o un polvo compactado. Se fabrica filtrando una suspensión del compuesto, secando la torta del filtro húmeda, moliendo la torta seca hasta un polvo fino y calentando el polvo a 900 °C. No se ensayó la osteoinductividad.

El documento US 2005/01912226-A1 (Tuan et al) se refiere a un método para preparar polvo de hidroxiapatita. El polvo de hidroxiapatita se obtuvo calentando escamas de pez a temperaturas incluyendo 600 °C, 700 °C o 900 °C para retirar el componente orgánico y recoger el polvo inorgánico. La divulgación se refiere además a un cuerpo poroso de hidroxiapatita, que se obtuvo sinterizando el polvo de hidroxiapatita. No se ensayó la osteoinductividad.

Grossin et al - (2010) "Biomimetic apatite sintered at very low temperature by spark plasma sintering: Physico-chemistry and microstructure aspects". Acta Biomaterialia, vol. 6 (n.º 2). pp. 577-585 se refiere a una chispa de plasma sinterizado, que se usó para consolidar apatitas nanocristalinas a temperaturas no convencionales muy bajas (T < 300 °C) de tal manera que se preservara la capa hidratada superficial presente en los nanocristales. Se obtuvieron monolitos biocerámicos en lugar de gránulos.

El documento US 6.689.375 B1 (Wahlig et al) - se refiere a un material de implante óseo reabsorbible y a un método para producir el mismo. El componente en polvo del material de implante consiste esencialmente en una mezcla de polvo de apatita de hidroxilo y polvo de sulfato cálcico, en el que el polvo de apatita de hidroxilo consiste en nanopartículas cristalinas preparadas sintéticamente precipitadas, informado teniendo un tamaño de cristal de 10-20 nm de anchura y 50-60 nm de longitud. El área superficial BET de absorción específica de los nanocristales se informó, preferentemente, ser 100-150 m²/g.

El documento US 6.013.591 (Ying et al.) se refiere a métodos para la síntesis de apatitas nanocristalinas. La divulgación informa de una serie de parámetros específicos de reacción que supuestamente pueden ajustarse para entallar las propiedades del producto recubierto. Se proporcionan informadas composiciones particulares de apatita que tienen un tamaño de cristal promedio de menos de 150 nm. SE cita que los productos pueden tener un área superficial de al menos 40 m²/g. Las utilidades citadas para las composiciones son como implantes protésicos y recubrimientos para implantes protésicos.

Spouer et al (2011) "In vivo behaviour of lowtemperature calcium deficient hydroxyapatite: comparison with deproteinised bovine bone", INTERNATIONAL ORTHOPAEDICS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 35, n.º 10, páginas 1553-1560 [citado como se publicó en línea el 19 de agosto de 2010] describe las propiedades osteoconductoras biológicas de hidroxiapatita deficiente en calcio porosa sintética a baja temperatura y las compara con las de la apatita biológica.

Divulgación de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar un material de fosfato cálcico que exhiba osteoinductividad y que se produzca fácilmente.

La invención se basa en el descubrimiento de un material granular que tiene una arquitectura definida a nanoescala que estimula la formación de nuevo tejido, principalmente la reparación ósea. El material es osteoconductor, osteoestimulador y osteoinductor. Específicamente, es osteoinductor en que cuando se implanta en un sitio no óseo (es decir, no un hueso), tal como intramuscular o subcutáneamente, induce que se forme nuevo tejido, principalmente nueva formación ósea. Se cree que las propiedades osteoinductoras de las composiciones de la invención se traducirán en formación/reparación ósea nueva más rápida cuando se implanta en un sitio óseo, de tal manera que se formará nuevo hueso a lo largo de toda la masa de injerto óseo en lugar de en los bordes de la masa de injerto óseo donde está en contacto con el hueso existente (como con los injertos óseos osteoconductores conocidos).

El proceso de la osteoinducción con el material descrito en el presente documento puede asociarse a altos niveles de expresión de BMP-2 por las células antes de y durante la formación de hueso nuevo. En particular, con el material descrito en este punto, pueden observarse altos niveles de expresión de BMP-2 por los pericitos vasculares antes de la formación del hueso. Durante la formación ósea, con el material descrito en este punto, pueden observarse altos niveles de expresión de BMP-2 por los osteoblastos, los osteocitos y los fibroblastos alrededor de los gránulos. Puede observarse una expresión relativamente baja de BMP-7 por las células alrededor de los gránulos antes de y/o durante la formación de hueso nuevo.

En un aspecto la invención proporciona un material de fosfato cálcico granular poroso, que comprende gránulos porosos discretos que contiene cada uno cristales (cristalitos, granos de cristal) de al menos un fosfato cálcico, en el que

- (i) al menos el 90 % de dichos cristales de los gránulos tienen un tamaño de cristal en el intervalo de 10-100 nm, donde el tamaño de cristal es la dimensión más grande del cristal como se ve en un MEB en sección transversal,
- (ii) al menos el 90 % de los poros en los gránulos tienen un tamaño de poro en el intervalo de 10-500 nm, en el que el tamaño de poro es la dimensión más grande del poro como se ve en un MEB en sección transversal,
- 5 (iii) el tamaño de poro promedio de los poros que tienen tamaños de poro en el intervalo de 10-500 nm en los gránulos está en el intervalo de 30-90 nm, como se mide por porosimetría de intrusión de mercurio,
- (iv) la porosidad en volumen total de los gránulos, medida usando el principio de Arquímedes, es al menos el 60 % y
- 10 (v) el área superficial de los gránulos, medida por el método BET, está en el intervalo de 10-70 m²/g, en la que al menos el 90 % de los cristales tienen al menos una dimensión de no más de 50 nm como se ve en un MEB en sección transversal y

en el que dichos cristales de dichos gránulos están en un estado sustancialmente sin sinterizar.

- 15 Preferentemente al menos el 90 % de dichos cristales tiene al menos una dimensión en el intervalo de 20-40 nm como se ven en un MEB en sección transversal.

Preferentemente la relación promedio de la dimensión más larga de cada cristal a la dimensión más corta del mismo está en el intervalo de 1-10, preferentemente en el intervalo de 1,5-3.

- 20 Preferentemente al menos el 50 % de los poros en los gránulos tienen dicho tamaño de poro en el intervalo de 10-100 nm. Preferentemente dicho tamaño de poro promedio de los poros que tienen tamaños de poro en el intervalo de 10-500 nm en los gránulos está en el intervalo de 30-70 nm.

- 25 Preferentemente la porosidad en volumen total de los gránulos es al menos el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 % o el 80 %, más preferentemente en el intervalo del 70-90 %.

Preferentemente el área superficial de los gránulos está en el intervalo de 10-60 m²/g o 20-40 m²/g.

- 30 En otro aspecto, la invención consiste en el uso del material de fosfato cálcico de la invención descrito anteriormente como un material de injerto óseo, un material de reemplazamiento óseo o un material sustituto óseo.

Además la invención consiste en el material de fosfato cálcico de la invención como se describe anteriormente, para su uso en la reparación ósea, por osteoinducción.

- 35 También se describe en el presente documento un método para el tratamiento de un mamífero por crecimiento óseo, que comprende colocar un material de fosfato cálcico de la invención como se describe anteriormente en un sitio en el que ha de tener lugar el crecimiento óseo.

- 40 También se describe en el presente documento un método para fabricar un material de fosfato cálcico como se describe anteriormente, que comprende las etapas de:

- (a) preparar una dispersión de cristales de fosfato cálcico en una fase líquida,
- (b) retirar parcialmente la fase líquida para obtener una masa compactada húmeda que comprende los cristales de fosfato cálcico,
- 45 (c) secar dicha masa compactada húmeda obtenida en la etapa (b) para retirar la fase líquida y obtener el material secado en forma de una masa compactada seca que comprende los cristales de fosfato cálcico, en la que la masa compactada seca tiene una porosidad total de no menos del 50 %, como se mide por el método de Arquímedes, antes de la etapa de tratamiento por calor (d),
- 50 (d) tratar por calor dicho material secado obtenido en la etapa (c), a una temperatura en el intervalo de 200 a 1000 °C, preferentemente 700 a 900 °C, evitando sustancialmente la sinterización de los cristales y
- (e) antes o después de la etapa (d), dividir la masa compactada seca en gránulos.

- 55 Preferentemente, en la etapa (c) dicha porosidad total de dicha masa compactada seca no es menos del 60 %, más preferentemente no menos del 70 %.

El material de la invención comprende de esta manera gránulos de fosfato cálcico que tienen una arquitectura específica de cada gránulo. Específicamente, el tamaño de los cristales que conforman los gránulos (CS), el tamaño de los poros a través de los gránulos (PS), la porosidad total de los gránulos (TP) y el área superficial de los gránulos (SA) se controlan por el control de los parámetros de procesamiento durante la producción de los gránulos y estos cuatro parámetros (CS, PS, TP y SA) tienen intervalos de valores definidos. El tamaño de gránulo también puede controlarse de forma adecuada. Esto significa que para un material dado de fosfato cálcico, los parámetros de procesamiento durante la producción de los gránulos pueden optimizarse para producir gránulos que tienen los valores apropiados.

65

El material de la invención será sintético, por lo que se entiende sintetizado artificialmente por intervención humana, o puesto de otra manera, que no deriva de materiales fuente biológicos por ejemplo escamas de pez. Esto permite un control más preciso de los parámetros de los cristales, los poros y los gránulos como se definen en el presente documento.

5 Para el material de la invención, los parámetros que son significativos para las propiedades deseadas, son el tamaño de los cristales que conforman los gránulos (CS), el tamaño de los poros a través de los gránulos (PS), la porosidad total de los gránulos (TP) y el área superficial de los gránulos (SA). El tamaño de los gránulos (GS) puede determinarse por ejemplo por métodos establecidos para seleccionar intervalos de tamaño de gránulos tamizando el material a través de una serie de tamices de tamaños definidos.

15 En la invención, la morfología de los cristales es preferentemente de alguna manera de forma acicular, de tal manera que una dimensión del cristal es más larga que las otras dimensiones. El tamaño (la dimensión más larga) de los cristales que conforman los gránulos (CS) está en el intervalo de tamaño de 10 a 100 nm, u opcionalmente 10 a 80, o 10 a 90, preferentemente con al menos una dimensión de los cristales de un tamaño menos que 50 nm. Preferentemente, al menos una dimensión de los cristales tiene un tamaño en el intervalo de 20 a 40 nm. La relación de la dimensión más larga a la dimensión más corta (que es la dimensión más corta en la dirección perpendicular a la dimensión más larga) debe estar en el intervalo de 1 a 10, preferentemente en el intervalo de 1,5 a 3. El tamaño y la morfología del cristal pueden determinarse usando microscopio electrónico de barrido, en particular en un MEB de una sección transversal (donde los cristales se ven en dos dimensiones). Como se indica anteriormente con preferencia al menos el 90 %, o al menos el 95 %, de dichos cristales tienen este intervalo de tamaño.

25 En la invención, el tamaño típico (la dimensión más larga) de los poros a través de los gránulos (PS) está en el intervalo de tamaño de 10 a 500 nm. Al menos el 90 % de los poros por número está en este intervalo de tamaño. Preferentemente la mayoría (al menos el 50 % en número) está en el intervalo de tamaño de 10 a 100 nm.

30 El tamaño medio de poro está en el intervalo de 30 a 90 nm, preferentemente en el intervalo de 30-70 nm. La mayoría de los poros está preferentemente dentro de este intervalo de tamaño de 30 a 90 nm, normalmente del 60 al 100 % de los poros caen dentro de este intervalo de tamaño, preferentemente más del 80 % y más preferentemente más del 90 %. Aunque que el material de la invención puede tener más del 95 % de poros en este intervalo, en la práctica puede haber un número de poros más grande. El tamaño medio de poro y la distribución del tamaño de poro se miden usando porosimetría de intrusión de mercurio.

35 Dentro de los gránulos, puede haber algunos poros grandes o huecos de tamaño mayor que 500 nm, por ejemplo 1 μm o más. Dichos poros grandes o huecos se excluyen del cálculo del tamaño promedio de poro.

40 En la invención, la porosidad total de los gránulos (TP) es tal que en términos de volumen, un volumen mayor del gránulo es porosidad que material. La porosidad total de los gránulos es normalmente mayor del 60 % y está preferentemente en el intervalo del 70 al 90 % de la porosidad total. Para la clarificación un ejemplo de lo anterior podría ser que para un gránulo dado, el 70 % del gránulo es porosidad, teniendo los poros un tamaño medio de poro de 30 a 70 nm, estando compuesto el componente material del gránulo (para este ejemplo, el restante 30 % del volumen) por cristales con una dimensión en el intervalo de 10 a 100 nm, u opcionalmente de 10 a 80 o de 10 a 90 nm, teniendo al menos una dimensión de los cristales un tamaño en el intervalo de 20 a 40 nm. Esta porosidad total (TP) se mide usando el principio de Arquímedes, como se describe en el ASTM C373.

45 En la invención, el área superficial de los gránulos (SA) es mayor que los materiales de injerto óseo de fosfato cálcico típicos conocidos, debido a los valores de CS, PS y TP como se describen anteriormente dando como resultado un material con un área superficial específica alta (expresado en m^2/g). El material de fosfato cálcico de la invención, con los valores de CS, PS y TP como se describen anteriormente, tiene un área superficial específica entre 10 y 70 m^2/g , preferentemente entre 10 y 60 m^2/g , más preferentemente 20-40 m^2/g . El área superficial específica (SA) se mide usando el método BET, que utiliza la adsorción de N_2 a la superficie del material.

50 En la invención, el tamaño de los gránulos (GS) del material, con los otros cuatro parámetros (CS, PS, TP y SA) como se describen anteriormente, está normalmente en el intervalo de 50 μm a 100 μm . Dentro de este intervalo, pueden seleccionarse intervalos de tamaño de partícula más estrechos, de acuerdo con el uso pretendido, por ejemplo intervalos más estrechos de 100-500 μm , 500-1000 μm , 1-2 mm, 2-5 mm, 5-10 mm, dependiendo de la aplicación clínica del material como un sistema de injerto óseo. Aunque el intervalo del tamaño de gránulo está normalmente dentro de estos intervalos, el material de la invención puede tener también un intervalo más estrecho, por ejemplo de 200 a 300 μm , o puede tener gránulos de un intervalo de escalas de tamaño que afecten la manera en que se empaquetan juntos. Por ejemplo, una distribución bimodal puede ser apropiada para ciertas aplicaciones, tales como gránulos que tienen tamaños en los intervalos de 200 a 300 μm y de 1 a 2 mm; las proporciones relativas de estos pueden diseñarse para optimizar su empaquetamiento.

65 Los límites superior e inferior contenidos en el presente documento para los parámetros físicos de los gránulos, específicamente el tamaño de cristal para el fosfato cálcico en los gránulos, los rasgos de porosidad de los gránulos y el área superficial de los gránulos, se eligen para que el material granular pueda tener el efecto en las proteínas

absorbentes que inducen que se forme el hueso. El resultado es que el nuevo hueso se forma a lo largo de toda la porosidad de los gránulos. El tamaño del cristal es de importancia para obtener los rasgos de porosidad a nanoescala. La gran área superficial de los gránulos aumenta la disponibilidad de sitios para el crecimiento óseo a lo largo de todo el volumen de los gránulos. El tamaño de los gránulos puede seleccionarse de acuerdo con el uso pretendido, como se describe en el presente documento. Los gránulos que tienen el tamaño o tamaños seleccionados son discretos, no estando unidos entre sí, para transportar en esta forma granular (particulada) al sitio donde se quiere el crecimiento óseo.

La frase "fosfato cálcico" se usa en la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, para abarcar numerosos materiales basados en fosfato cálcico, como es habitual en este campo técnico. Los materiales específicos se analizan más abajo, pero la frase "fosfato cálcico" en este punto incluye los materiales en la siguiente lista no limitante:

fosfato α - y β -tricálcico
 apatita
 dihidrógeno fosfato cálcico y su hidrato
 hidrógeno fosfato cálcico, anhidro e hidrato
 hidroxiapatita, incluyendo hidroxiapatita deficiente en calcio
 carbonato de apatita
 fosfato dicálcico, anhidro y deshidrato
 fluoroapatita
 fosfato monocálcico, anhidro y monohidrato
 fosfato octacálcico.

Dos o más fosfatos cálcicos pueden emplearse en los gránulos del material de la invención, bien en gránulos diferentes o bien mezclados en cada gránulo.

Los materiales de fosfato cálcico particularmente preferidos, que son reabsorbibles, incluyen, y no se limitan a, hidroxiapatita estequiométrica con una relación molar Ca/P de 1,667, una apatita deficiente en calcio con una relación molar Ca/P de entre 1,50 y 1,667, una hidroxiapatita químicamente modificada en la que uno o más iones son sustituidos parcial o completamente por otros ion o iones y una apatita deficiente en calcio químicamente modificada, en la que uno o más iones son sustituidos parcial o completamente por otro ion o iones. Un ejemplo de esto es una hidroxiapatita sustituida con carbonato en la que los iones carbonato sustituyen iones fosfato y/o hidroxilo. Un ejemplo adicional es una hidroxiapatita sustituida con silicato en la que los iones silicato sustituyen iones fosfato. En algunos casos, estas sustituciones iónicas dan como resultado cambios concomitantes en la composición de la hidroxiapatita, tales como la pérdida de iones hidroxilo o calcio para retener el equilibrio de cargas. Otro ejemplo es una apatita deficiente en calcio sustituida con silicato en la que los iones silicato sustituyen iones fosfato y la relación molar Ca/(P+Si) es menos que 1,667. Pueden realizarse muchas otras sustituciones en el material de hidroxiapatita o hidroxiapatita deficiente en calcio en el material de la presente invención. Estos incluyen, pero no se limitan a estroncio, sodio, potasio, magnesio, bario, litio, cinc, plata, titanio, cobalto, cobre, níquel, hierro, nitrato, sulfato, fluoruro y cloruro. Los iones descritos anteriormente pueden sustituir solos o en combinaciones. Algunos iones pueden sustituir en diversos estados de valencia y estos pueden incluir la sustitución de por ejemplo iones silicato como SiO_4^{4-} , $\text{Si}_2\text{O}_7^{6-}$, SiO_3^{2-} etc. bien solos o en combinación.

Otros fosfatos cálcicos preferidos usados en la invención incluyen, pero no se limitan a, fosfato tricálcico (TCP), que puede existir bien en el polimorfo beta o el alfa, o fosfatos cálcicos bifásicos (BCP), que consisten en mezclas de hidroxiapatita y fases de fosfato tricálcico. En el caso del fosfato tricálcico, el proceso de producción descrito en este punto que da como resultado un material con valores de los cuatro parámetros (CS, PS, TP y SA) como se describen anteriormente favorece la formación del polimorfo beta de TCP. Sin embargo, el polimorfo alfa puede, en algunos casos, obtenerse a menores temperaturas que las temperaturas altas normales por la adición de otros iones (como se describe en el diagrama de fases de Nurse, J. Chem. Soc. 1959). La fase de fosfato tricálcico puede modificarse por lo que uno o más iones son sustituidos parcial o completamente por otro ion o iones, como se describe anteriormente para los casos de hidroxiapatita sustituida con iones e hidroxiapatita deficiente en calcio sustituida con iones. En el caso de BCP, la proporción relativa de la hidroxiapatita (HA) y las fases de fosfato tricálcico puede variar de esencialmente el 0 % de HA al 100 % de HA. La HA y/o las fases de fosfato tricálcico en el BCP pueden modificarse por lo que uno o más iones son sustituidos parcial o completamente por otro ion o iones, como se describe anteriormente para los casos de hidroxiapatita sustituida con iones e hidroxiapatita deficiente en calcio sustituida con iones.

Pueden usarse otros fosfatos cálcicos en la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse fosfato octacálcico, brushita, monetita y fosfato tetracálcico solos o como fases adicionales en lo anterior. Cuando el fosfato cálcico no es cristalino, la referencia al tamaño de cristal en el presente documento es una referencia al tamaño de las nanopartículas del material.

Pueden añadirse otras fases a los fosfatos cálcicos descritos anteriormente en los gránulos. Dichas fases distintas incluyen pero no se limitan a, carbonato cálcico, sulfato cálcico, silicato cálcico, vidrio de silicato cálcico, vidrio

basado en silicato cálcico, vidrio de fosfato cálcico, vidrio basado en fosfato cálcico, vidrio cerámico basado en silicato cálcico, vidrio cerámico basado en fosfato cálcico, vidrio bioactivo, vidrio cerámico bioactivo, vidrios biocompatibles, vidrios cerámicos biocompatibles, alúmina y circonia. Los materiales a base de fosfato cálcico en esta lista no son activos en el crecimiento óseo y están preferentemente ausentes. La cantidad de dichas fases distintas es preferentemente menos del 50 % en peso, más preferentemente menos del 3 % en peso. Sin embargo se prefiere en la invención que los gránulos consistan totalmente o de forma sustancial totalmente en fosfato cálcico (por ejemplo ≥ 99 % en peso).

En el método para producir el material de la invención, el fosfato cálcico debe dispersarse preferentemente en una fase líquida. Esta dispersión puede resultar de la síntesis del material de fosfato cálcico, tal como por precipitación acuosa, o el polvo de fosfato cálcico puede dispersarse en un disolvente adecuado, normalmente agua o un disolvente a base de agua. El fosfato cálcico en la dispersión debe tener un tamaño de cristal primario pequeño de menos de 100 nm, u opcionalmente menos de 80 o 90 nm, para formar el material con valores de los cuatro parámetros (CS, PS, TP y SA) como se describen anteriormente. El fosfato cálcico puede estar presente en la dispersión como cristales primarios y/o aglomerados de cristales primarios.

Puede incluirse una o más fases distintas en la dispersión, si se desea incorporar un material de fosfato no cálcico adicional en los gránulos.

El fosfato cálcico dispersado en una fase líquida se procesa para formar el material con valores de los cuatro parámetros (CS, PS, TP y SA) como se describen anteriormente. El fosfato cálcico dispersado en una fase líquida puede describirse como una suspensión. La cantidad (gramos, g) de fase sólida (fosfato cálcico) dispersada en la fase líquida (litros, l) puede variar de 1500 g/l a 0,1 g/l, preferentemente entre 150 g/l y 10 g/l.

La primera etapa de procesamiento implica normalmente que la dispersión se procese para retirar la mayoría de la fase líquida para dejar una masa compactada húmeda de la fase sólida. Los métodos adecuados para esta etapa son la filtración al vacío, usando por ejemplo un embudo Buchner, papel de filtro y una bomba de vacío (con o sin una masa/fuerza aplicada a la masa compactada que se filtra de la fase sólida), una prensa de filtro, que aplica una presión de compactación a la suspensión exprimiendo eficazmente el agua fuera de la masa que se compacta de la fase sólida, o la centrifugación. En esta etapa la retirada de la fase líquida y la compactación de la masa de la fase sólida se controlan para retener la porosidad total (TP) apropiada después de la posterior etapa de secado. Si la masa compactada se deja compactar demasiado, la porosidad total puede caer a niveles por debajo del 60 % o por debajo del 50 % y para el intervalo preferido de porosidad total del 70 al 90 %, debe controlarse el proceso de retirar la fase líquida. Esto significa no aplicar una fuerza de vacío demasiado alta durante la filtración al vacío (o controlar la masa/fuerza aplicada durante la filtración al vacío), controlar la fuerza de compactación aplicada durante la presión de filtrado o controlar la fuerza centrífuga y la duración durante la centrifugación. Aunque estos parámetros pueden variar significativamente dependiendo del equipo usado, la cantidad de fosfato cálcico en la dispersión, el tipo de fase líquida usada y el tipo de fosfato cálcico usado, la medida en que se ha usado un conjunto adecuado de condiciones de procesamiento en esta primera etapa es tal que la porosidad total de la masa compactada de la fase sólida, después de secar a por ejemplo, pero no limitado a, entre 50 y 150 °C, medida usando el ASTM C373, es mayor del 50 %, preferentemente mayor del 60 %, más preferentemente en el intervalo del 70 al 90 % de la porosidad total. Normalmente la etapa de secado a entre, pero no limitado a, 50 y 150 °C, es para retirar agua adicional de la masa compactada húmeda de la fase sólida para producir una masa compactada seca de la fase sólida para el procesamiento adicional.

Dentro de la suspensión, la interacción de los cristales de fosfato cálcico dispersos en la fase líquida puede alterarse lo que cambiará el empaquetamiento de los cristales dentro de la masa compactada de la fase sólida. Dichas alteraciones pueden realizarse cambiando el pH de la fase líquida, o la adición de un tensioactivo, que puede cambiar la carga superficial de los cristales y por lo tanto la carga electrostática entre los cristales. Este es otro método para cambiar y/o controlar la porosidad total (TP) y el área superficial (SA) del sistema de injerto óseo descrito en el presente documento.

La siguiente etapa de procesamiento implica calentar la masa compactada seca de la fase sólida a una temperatura adecuada para retirar cualquier componente volátil y controlar el tamaño del cristal (CS) y el tamaño de poro (PS) dentro de la masa compactada seca de la fase sólida a valores con los intervalos descritos anteriormente. Esta segunda etapa puede realizarse directamente en la masa compactada seca de la fase sólida obtenida después de la primera etapa de procesamiento o la masa compactada seca de la fase sólida puede romperse en trozos más pequeños o puede darse un tamaño del intervalo del tamaño de gránulo (GS) deseado como se describe anteriormente. La temperatura usada para calentar la muestra se controla de manera que los procesos de crecimiento de cristal y la sinterización se evitan o bien simplemente están comenzando. Esto asegura que el tamaño del cristal (CS), el tamaño de poro (PS) y el área superficial (SA) de la masa compactada seca de la fase sólida retenga los valores dentro de los intervalos descritos anteriormente. Normalmente, la temperatura usada para este tratamiento de calor está entre 200 y 1000 °C, preferentemente, entre 700 y 900 °C. La duración del tratamiento con calor a esta temperatura es normalmente 1-4 horas, pero son apropiados tiempos más cortos o más largos, con la condición de que los procesos de crecimiento del cristal y la sinterización se eviten o bien simplemente estén comenzando. La atmósfera para el calentamiento puede ser aire, o puede ser una atmósfera enriquecida en un gas apropiado, incluyendo vapor de agua. Utilizando un tratamiento con calor entre 200 y 1000 °C, preferentemente

entre 700 y 900 °C, puede lograrse que los cristales en la masa compactada de la fase sólida no se sometan a sinterización, de manera que el producto final no se clasifique como una cerámica. Una cerámica se asocia a un material inorgánico que se ha sometido a densificación durante un tratamiento con calor a alta temperatura y se asocia a un aumento en la densidad y el tamaño del cristal y una disminución en la porosidad total y el tamaño de poro. Una cerámica también se asocia a la formación de "cuellos" entre granos o cristales adyacentes, pareciendo que estos granos o cristales adyacentes estén fusionados juntos; esto puede observarse usando análisis MEB. Este es un enfoque diferente a otra técnica anterior, tales como el documento US 6.511.510 y el documento US 7.942.934, que forman cerámicas usando temperaturas elevadas, es decir 100-1275 °C (preferentemente 150-1250 °C) y 1050-1150 °C, respectivamente.

El material de fosfato cálcico granular de la invención descrito en el presente documento puede esterilizarse usando métodos industriales convencionales tales como u óxido de etileno. También están disponibles los métodos de esterilización ionizante de irradiación gamma, haz de electrones y esterilización con rayos X.

El material de fosfato cálcico granular de la invención descrito en el presente documento puede usarse para tratar un abanico de defectos óseos, traumatismos óseos y fusiones óseas. Por ejemplo, los gránulos del sistema de injerto óseo pueden empaquetarse en defectos óseos o colocarse en sitios que requieran que se forme nuevo hueso, tales como en la fusión espinal posterolateral o en la fusión espinal intercorporal. Estos gránulos pueden implantarse directamente o mezclarse con agua, solución salina, sangre o aspirado de médula ósea u otro medio apropiado, antes de la implantación. Los gránulos pueden administrarse también como una pasta o masilla mezclando con un vehículo soluble apropiado, tal como pero no restringido a polímeros reabsorbibles tales como carboximetilcelulosa o un copolímero en bloque de óxido de etileno/óxido de propileno o un polímero natural tal como colágeno o fibrina.

Además, el material de fosfato cálcico granular de la invención descrito en el presente documento puede combinarse con biomoléculas activas tales como proteínas de factor de crecimiento (tales como proteínas morfogenéticas óseas), antibióticos (tales como gentamicina) u otros fármacos farmacéuticos, citocinas o anticuerpos.

Además, el material de fosfato cálcico granular de la invención descrito en el presente documento puede combinarse con células. Esto puede realizarse en la sala de operaciones, inmediatamente antes de la implantación o previamente cuando las células pueden cultivarse durante un periodo de tiempo en los gránulos antes de la implantación. Dichas células incluyen, pero no se restringen a, células madre del mesénquima autógenas, células madre del mesénquima alogénicas, células progenitoras de osteoblastos, osteoblastos, células endoteliales y combinaciones de éstas.

Introducción de los dibujos

La Figura 1 es una imagen de microscopio óptico de una sección histológica del sistema de injerto óseo del Ejemplo 2 de la invención, después de la implantación en el músculo de una oveja, como se describe a continuación.

La Figura 2 es una imagen de microscopio óptico que muestra la expresión de la fosfatasa alcalina por las células en un área de formación ósea nueva en la superficie de los gránulos implantados del sistema de injerto óseo del Ejemplo 2.

La Figura 3 es una imagen de microscopio óptico que muestra la no expresión de la fosfatasa alcalina en la vecindad de los gránulos implantados de un sistema de la técnica anterior, usado para el control.

La Figura 4 es una imagen de microscopio electrónico de barrido (MEB) que muestra la superficie de los gránulos en el sistema de injerto óseo del Ejemplo 2.

La Figura 5 es una imagen MEB de la superficie de los gránulos de un material cerámico sinterizado de hidroxiapatita comparativo.

Realizaciones de la invención y datos experimentales

La presente invención se ilustra ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras que acompañan.

Los Ejemplos 1 a 4 describen la producción de ejemplos de los materiales granulares de la invención. El tamaño de poro promedio de cada uno de estos materiales está en el intervalo de 30-70 nm, medido por porosimetría de mercurio. Los poros están en el intervalo de tamaño de 10-500 nm, con al menos el 50 % de los poros en el intervalo de tamaño de 10-100 nm, como se ve en una sección transversal MEB del gránulo.

EJEMPLO 1

Producción del sistema de injerto óseo 1 (Hidroxiapatita, HA)

Una suspensión de hidroxiapatita (HA) que consistía en aproximadamente 50 g de cristales de HA se dispersó en 500 ml de solución acuosa alcalina (agua con 10 ml de solución de amoníaco añadidos) se prepara mediante una reacción de precipitación acuosa convencional. Para el fin de este ejemplo, esto implica la adición gota a gota de

una solución de ácido fosfórico a una suspensión de hidróxido cálcico, con una relación molar Ca/P de 1,667 y se mantiene a un pH de entre 10 y 11, pero son apropiados otros métodos de síntesis. Se obtiene una masa compactada húmeda de la fase sólida (hidroxiapatita) retirando la solución acuosa pasando la suspensión de hidroxiapatita a través de papel de filtro en un embudo de filtro Buchner fijado a un matraz Erlenmeyer con un brazo lateral fijado a una bomba de vacío y recogiendo la fase sólida. El control crítico en esta etapa es controlar la retirada de la fase líquida y la compactación de la masa de la fase sólida para retener un alto nivel de porosidad total (TP). Se usó una bomba de vacío para crear un vacío en el matraz y el vacío se creó durante un tiempo de tal manera que aproximadamente el 80-90 % en masa del agua se retirara, de esta manera no compactando del todo la fase sólida durante la retirada de la fase acuosa. En el presente ejemplo el vacío se creó durante solo 30 minutos. La fase sólida compactada húmeda se secó posteriormente en un horno a 80 °C.

La masa compactada secada de la fase sólida (hidroxiapatita) se rompió en tamaños más pequeños usando un mortero y una maja y se seleccionó un intervalo de tamaño de los gránulos entre 1 y 2 mm usando una serie de tamices. La porosidad total de los gránulos en varias muestras preparadas de esta manera se midió usando el método descrito en ASTM C373 y los valores estaban en un intervalo del 74-84 %. Los gránulos se calentaron en un horno a 700 °C durante 1 hora. La porosidad total de los gránulos calentados estuvo en el intervalo del 66-76 %, con un valor medio del 71 %.

El área superficial (SA) de los gránulos, como se midió por el método BET, fue 27 m²/g. La visión de la superficie de los gránulos por MEB reveló que las dimensiones de los cristales (CS) estaban en el intervalo de 50-90 nm en la dimensión más larga, pero variando una dimensión más corta del cristal (ancho) entre 20 y 40 nm.

EJEMPLO 2

Producción del sistema de injerto óseo 2 (hidroxiapatita sustituida con silicio, Si-HA)

Una suspensión de hidroxiapatita sustituida con silicio que consistía en aproximadamente 50 g de cristales de Si-HA se dispersó en 500 ml de solución acuosa alcalina (agua con 10 ml de solución de amoníaco añadidos) se prepara mediante una reacción de precipitación acuosa convencional. Para el fin de este ejemplo, esto implica la adición gota a gota de una solución de ácido fosfórico a una suspensión de hidróxido cálcico que contiene ortosilicato de tetraetilo (TEOS), con una relación molar Ca/P de 2,45 y una relación molar Ca/(P+Si) de 1,64 y se mantiene a un pH de entre 10 y 11, pero son apropiados otros métodos de síntesis. Como para el EJEMPLO 1, se obtiene una masa compactada húmeda de la fase sólida (hidroxiapatita sustituida con silicio) retirando la solución acuosa pasando la suspensión de hidroxiapatita sustituida con silicio a través de papel de filtro en un embudo de filtro Buchner fijado a un matraz Erlenmeyer con un brazo lateral fijado a una bomba de vacío y recogiendo la fase sólida. Se usó una bomba de vacío para crear un vacío en el matraz y el vacío se creó durante un tiempo de tal manera que aproximadamente el 80-90 % en masa del agua se retirara, de esta manera no compactando del todo la fase sólida durante la retirada de la fase acuosa. En el presente ejemplo el vacío se creó durante solo 30 minutos. La fase sólida compactada húmeda se secó posteriormente en un horno a 80 °C.

La masa compactada secada de la fase sólida (hidroxiapatita sustituida con silicio) se rompió en tamaños más pequeños usando un mortero y una maja y se seleccionó un intervalo de tamaño de los gránulos entre 1 y 2 mm usando una serie de tamices. La porosidad total de los gránulos se midió usando el método descrito en ASTM C373 y los valores estaban en un intervalo del 73-82 %. Los gránulos se calentaron en un horno a 900 °C durante 1 hora. La porosidad total de los gránulos calentados estuvo en el intervalo del 71-78 % con un valor medio del 75 % (n=5).

El área superficial (SA) de los gránulos, como se midió por el método BET, fue 28 m²/g. La visión de la superficie de los gránulos por MEB reveló que las dimensiones de los cristales (CS) estaban en el intervalo de 50-80 nm en la dimensión más larga, pero variando una dimensión más corta del cristal (ancho) entre 20 y 40 nm.

EJEMPLO 3

Producción del sistema de injerto óseo 3 (beta-fosfato tricálcico, β-TCP)

Usando los métodos descritos en los EJEMPLOS 1 y 2, una suspensión de apatita deficiente en calcio que consistía en aproximadamente 50 g de cristales de apatita con una relación molar Ca/P de 1,50 se dispersó en 500 ml de solución acuosa alcalina (agua con 10 ml de solución de amoníaco añadidos) se prepara mediante una reacción de precipitación acuosa convencional. Para el fin de este ejemplo, esto implica la adición gota a gota de una solución de ácido fosfórico a una suspensión de hidróxido cálcico, con una relación molar Ca/P de 1,50 y se mantiene a un pH de entre 7 y 8, pero son apropiados otros métodos de síntesis. Se obtiene la masa compactada húmeda de la fase sólida (apatita deficiente en calcio) y se convierte en una masa compactada seca y después en gránulos por el mismo proceso que se describe en los EJEMPLOS 1 y 2. Los gránulos, con una porosidad mayor del 65 % se calientan a 750 °C durante 1 hora. El análisis por difracción de rayos X reveló que la composición de fases era la del polimorfo beta del fosfato tricálcico. La porosidad total de los gránulos calentados estuvo en el intervalo del 65-77 % (n=5).

El área superficial (SA) de los gránulos, como se midió por el método BET, fue 25 m²/g. La visión de la superficie de los gránulos por MEB reveló que las dimensiones de los cristales (CS) estaban en el intervalo de 50-90 nm en la dimensión más larga, pero variando una dimensión más corta del cristal (ancho) entre 20 y 50 nm.

5 EJEMPLO 4

Producción del sistema de injerto óseo 4 (fosfato cálcico bifásico, BCP)

10 Usando los métodos descritos en los EJEMPLOS 1, 2 y 3, una suspensión de apatita deficiente en calcio que consistía en aproximadamente 50 g de cristales de apatita con una relación molar Ca/P de 1,58 se dispersó en 500 ml de solución acuosa alcalina (agua con 10 ml de solución de amoníaco añadidos) se prepara mediante una reacción de precipitación acuosa convencional. Para el fin de este ejemplo, esto implica la adición gota a gota de una solución de ácido fosfórico a una suspensión de hidróxido cálcico, con una relación molar Ca/P de 1,58 y se mantiene a un pH de entre 8 y 10, pero son apropiados otros métodos de síntesis. Se obtiene la masa compactada húmeda de la fase sólida (apatita deficiente en calcio) y se convierte en una masa compactada seca y después en gránulos por el mismo proceso que se describe en los EJEMPLOS 1 y 2. Los gránulos, con una porosidad total mayor del 65 % se calientan a 800 °C durante 1 hora. El análisis por difracción de rayos X reveló que la composición de fases era una mezcla bifásica del polimorfo beta del fosfato tricálcico e hidroxiapatita (aproximadamente en una relación del 50:50 %). La porosidad total de los gránulos calentados estuvo en el intervalo del 68-79 %, con un valor promedio del 73 % (n=5).

20 El área superficial (SA) de los gránulos, como se midió por el método BET, fue 22 m²/g. La visión de la superficie de los gránulos por MEB reveló que las dimensiones de los cristales (CS) estaban en el intervalo de 50-80 nm en la dimensión más larga, pero variando una dimensión más corta del cristal (ancho) entre 20 y 40 nm.

25 EJEMPLO 5

Adhesión de proteínas a los sistemas de injerto óseo de 1-4.

30 Para ensayar el efecto de los tamaños de los cristales y de los poros y los altos valores de las áreas superficiales de los sistemas de injerto óseo de los EJEMPLOS 1-4, se realizó una medición de la cantidad de proteínas de suero de una solución de 3 ml de suero bovino fetal al 1 % que se adhiere a 0,5 g de los gránulos después de 24 horas de remojo. Como una comparación, se ensayó un gránulo de hidroxiapatita poroso con una porosidad total similar a la de los gránulos de los EJEMPLOS 1-4, pero un tamaño de cristal de aproximadamente, 1 µm, un tamaño de poro mayor de aproximadamente 1 µm y un área superficial de 1,5 m²/g (denominado gránulos CONTROL). Usando el ensayo del ácido bicinónico (BCA) para medir la cantidad de proteínas presentes en la solución inicial de suero bovino fetal al 1 % y en las soluciones después de remojar los gránulos, la cantidad de proteínas de suero adheridas a los gránulos puede calcularse como la diferencia de estos dos valores. La cantidad de proteínas de suero adheridas a los gránulos producidos por los EJEMPLOS 1-4 fue el 39 % ± 5 % de las proteínas totales en la solución original de suero bovino fetal al 1 %, mientras que los gránulos CONTROL absorbieron el 9 % ± 3 % de las proteínas.

EJEMPLO 6

45 Demostración de la osteoinductividad del sistema de injerto óseo.

50 El sistema de injerto óseo descrito en el EJEMPLO 2 se implantó en defectos pequeños en los músculos en las espaldas de ovejas de 18 meses de edad. Después de 6 semanas, los especímenes/secciones explantados se procesaron por histología y se tiñeron (tetracromo) para identificar la nueva formación ósea. Las imágenes mostraron que se había formado nuevo hueso (teñido de azul) alrededor de los gránulos y a lo largo de todo el defecto (Figura 1). Un injerto óseo sintético no osteoinductor comparativo (disponible como ProOsteon 200R) no mostró nuevo hueso después de este tiempo de implantación y solamente la presencia de tejido fibroso denso alrededor de los gránulos.

55 La Figura 1 muestra la histología teñida con tetracromo del sistema de injerto óseo descrito en el EJEMPLO 2 implantado intramuscularmente en ovejas durante 6 semanas que muestran gránulos descalcificados (G) del sistema de injerto óseo, músculo hospedador (M) y nuevo hueso (NB) formado alrededor de los gránulos dentro del sitio del implante.

60 Las rebanadas de histología descalcificada se tiñeron usando inmunohistoquímica para mostrar la expresión positiva de la fosfatasa alcalina (AP), un marcador específico de la diferenciación de los osteoblastos y por lo tanto de la formación ósea; las células teñidas positivamente para AP aparecieron marrones. Dicha sección teñida se muestra en la Figura 2, donde las células (osteoblastos) teñidos positivamente para AP aparecen en la localización de formación de nuevo hueso (NB) en la superficie de los gránulos (G) en el experimento en el Ejemplo 6. Esto indica que se ha formado nuevo hueso por el reclutamiento de células madre del mesénquima del hospedador en el sitio de implantación intra-muscular y su diferenciación a osteoblastos, donde producen nuevo hueso. No hay evidencia

de la presencia de regiones significativas de condrocitos/tejido cartilaginoso en estas secciones, de tal manera que el nuevo hueso parece formarse a partir de una ruta directa, en lugar de a través de una fase intermedia de cartílago como se observa en la formación de hueso endocondral.

5 Por el contrario, un injerto óseo sintético no osteoinductor (ProOsteon 200R) no mostró osteoblastos teñidos positivamente para AP después de este tiempo de implantación y solamente la presencia de tejido fibroso denso (fibroblastos) rodeaba los gránulos (Figura 3).

10 La Figura 2 es una imagen de microscopio (x20) que muestra la expresión de la fosfatasa alcalina (AP) por las células (teñidas de marrón) en el área de formación de hueso nuevo (NB) en la superficie de los gránulos (G) del sistema de injerto óseo a nanoescala descrito en el EJEMPLO 2, implantado intramuscularmente en ovejas durante 6 semanas.

15 La Figura 3 es una imagen de microscopio (x20) que muestra la no expresión de la fosfatasa alcalina (AP) por las células (carencia de tinción marrón) en la vecindad de los gránulos (G) de ProOsteon 200R usado como un control osteoconductor, implantado intramuscularmente en ovejas durante 6 semanas.

20 La Figura 4 muestra una imagen de microscopio electrónico de barrido (MEB) de la superficie de los gránulos del sistema de injerto óseo a nanoescala descrito en el EJEMPLO 2, que muestra la estructura de nanoescala, incluyendo el tamaño y la forma, de los cristales que conforman los gránulos.

25 La Figura 5 muestra una imagen de microscopio electrónico de barrido (MEB) de la superficie de los gránulos de un material cerámico de hidroxiapatita macroporosa comparativa, que muestra la carencia de estructura de poros a nanoescala y la presencia de granos grandes fusionados que se han sinterizado juntos conformando los gránulos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un material de fosfato cálcico granular poroso, que comprende gránulos porosos discretos, conteniendo cada uno cristales de al menos un fosfato cálcico, en donde
- (i) al menos el 90 % de dichos cristales de los gránulos tienen un tamaño de cristal en el intervalo de 10-100 nm, donde el tamaño de cristal es la dimensión más grande del cristal como se ve en un MEB en sección transversal,
- (ii) al menos el 90 % de los poros en los gránulos tienen un tamaño de poro en el intervalo de 10-500 nm, en donde el tamaño de poro es la dimensión más grande del poro como se ve en un MEB en sección transversal,
- 10 (iii) el tamaño de poro promedio de los poros que tienen tamaños de poro en el intervalo de 10-500 nm en los gránulos está en el intervalo de 30-90 nm, como se mide por porosimetría de intrusión de mercurio,
- (iv) la porosidad en volumen total de los gránulos, medida usando el principio de Arquímedes, es al menos el 60 % y
- 15 (v) el área superficial de los gránulos, medida por el método BET, está en el intervalo de 10-70 m²/g,
- teniendo al menos el 90 % de los cristales al menos una dimensión de no más de 50 nm como se ve en un MEB en sección transversal y estando dichos cristales de dichos gránulos en un estado sustancialmente sin sinterizar.
- 20 2. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos el 90 % de dichos cristales tiene al menos una dimensión en el intervalo de 20-40 nm como se ve en un MEB en sección transversal.
3. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la relación promedio de dicha dimensión más larga de cada cristal a la dimensión más corta del mismo está en el intervalo de 1-10, preferentemente en el intervalo de 1,5-3.
- 25 4. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos el 50 % de los poros en los gránulos tienen dicho tamaño de poro en el intervalo de 10-100 nm.
- 30 5. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, estando dicho tamaño de poro promedio de los poros, que tienen tamaños de poro en el intervalo de 10-500 nm en los gránulos, en el intervalo de 30-70 nm.
- 35 6. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, estando la porosidad en volumen total de los gránulos en el intervalo del 70-90 %.
7. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, estando el área superficial de los gránulos en el intervalo de 20-40 m²/g.
- 40 8. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el o cada fosfato cálcico de dichos gránulos se selecciona de:
- 45 hidroxapatita estequiométrica,
 hidroxapatita deficiente en calcio,
 hidroxapatita estequiométrica o deficiente en calcio, en donde uno o más iones son sustituidos parcial o completamente,
 fosfato tricálcico y
 fosfato cálcico dibásico que consiste en fases de hidroxapatita y fosfato tricálcico.
- 50 9. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que tiene osteoinductividad, cuando se implanta en un sitio no óseo en un mamífero.
10. Uso de un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, como un material de injerto óseo, un material de reemplazamiento óseo o un material sustituto óseo.
- 55 11. Un material de fosfato cálcico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en la reparación ósea por osteoinducción.

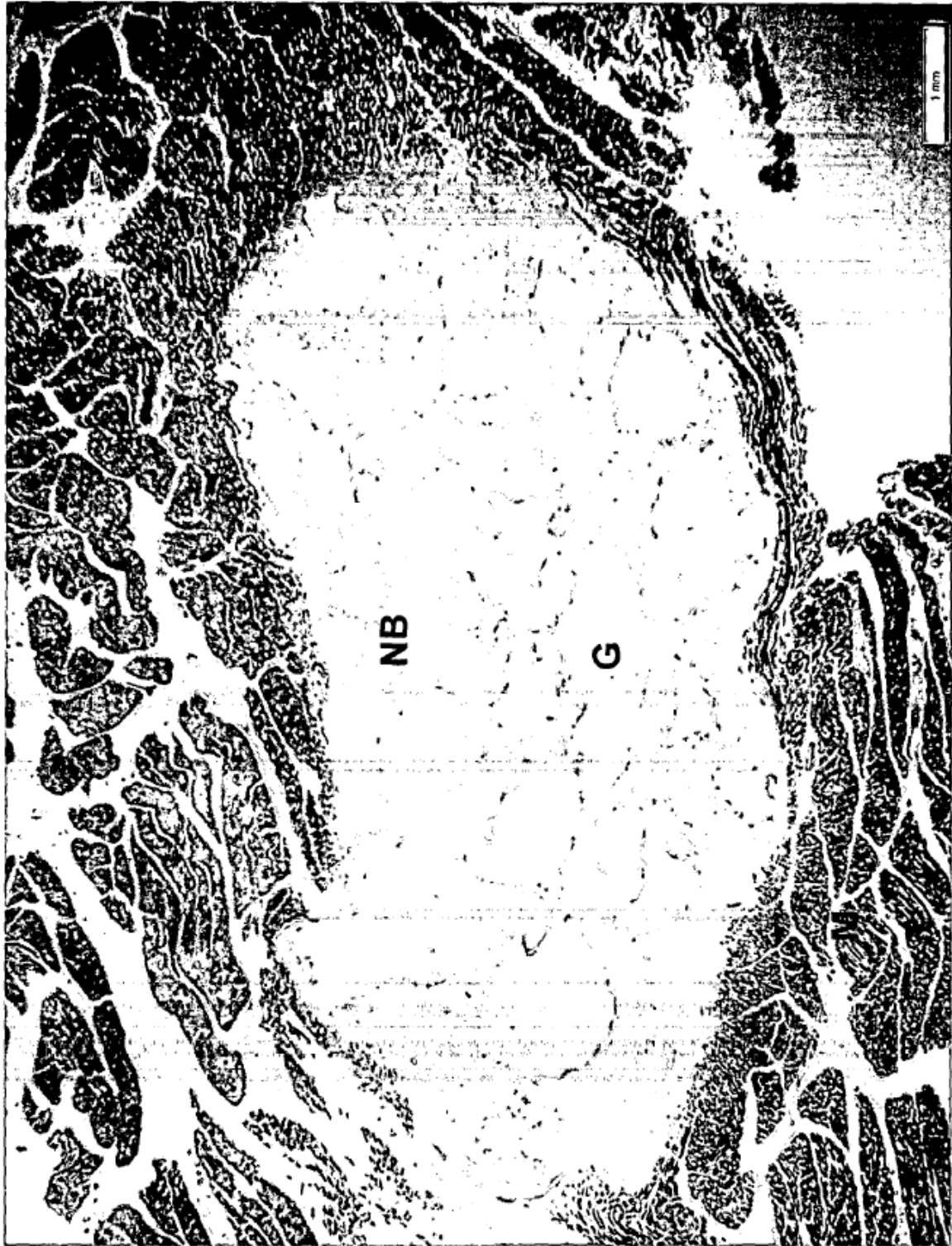


Fig. 1

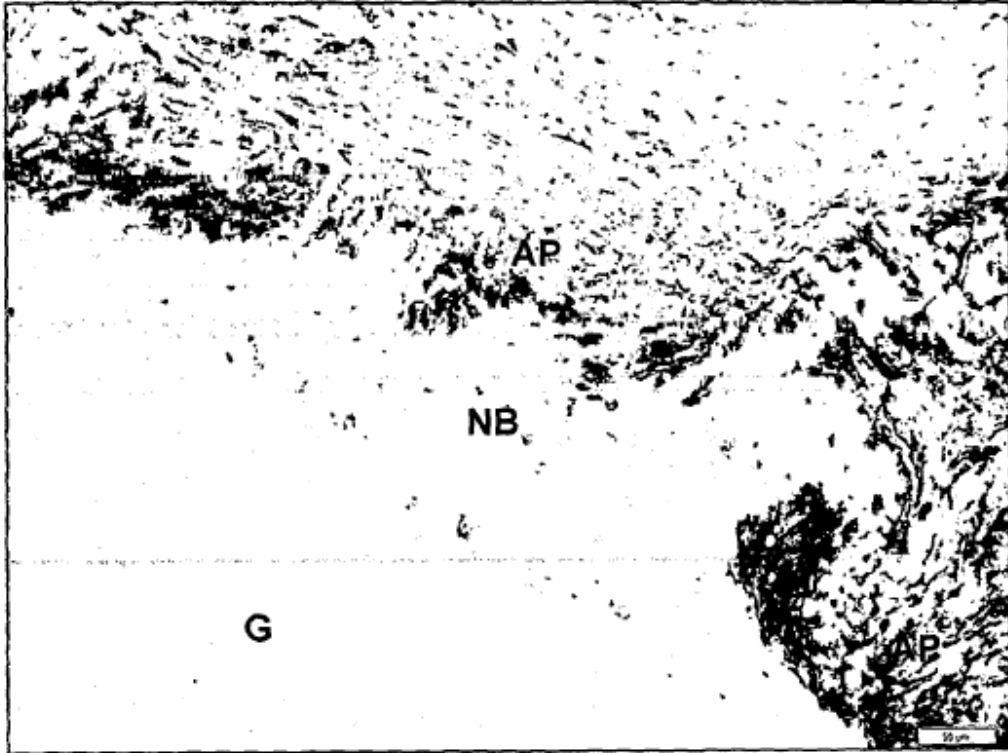


Fig. 2

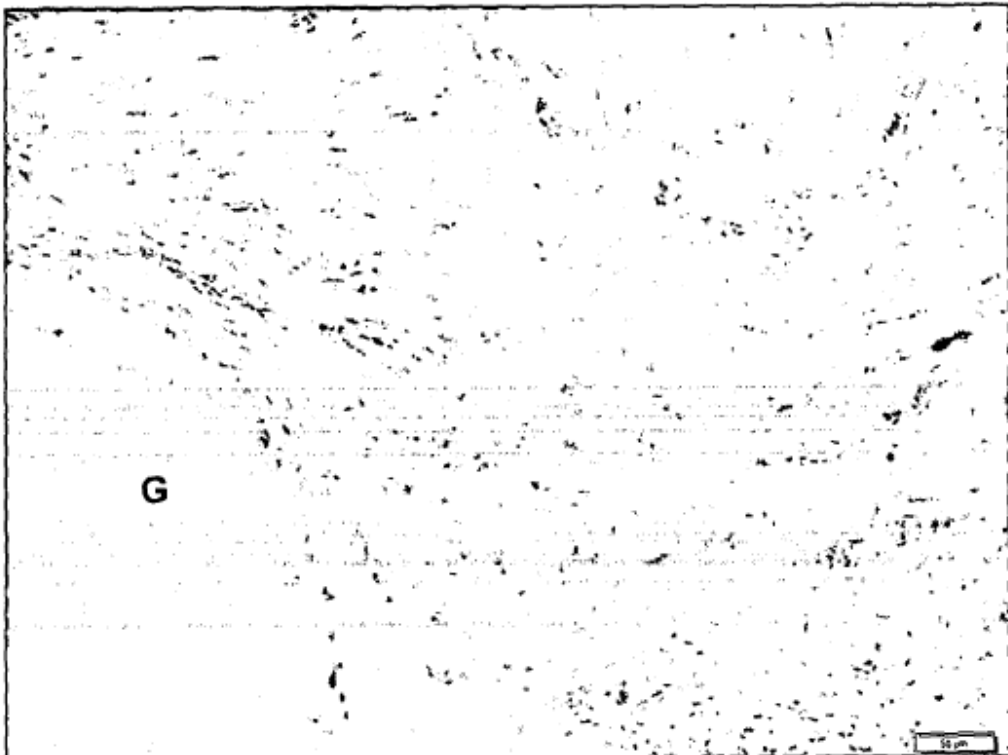


Fig. 3

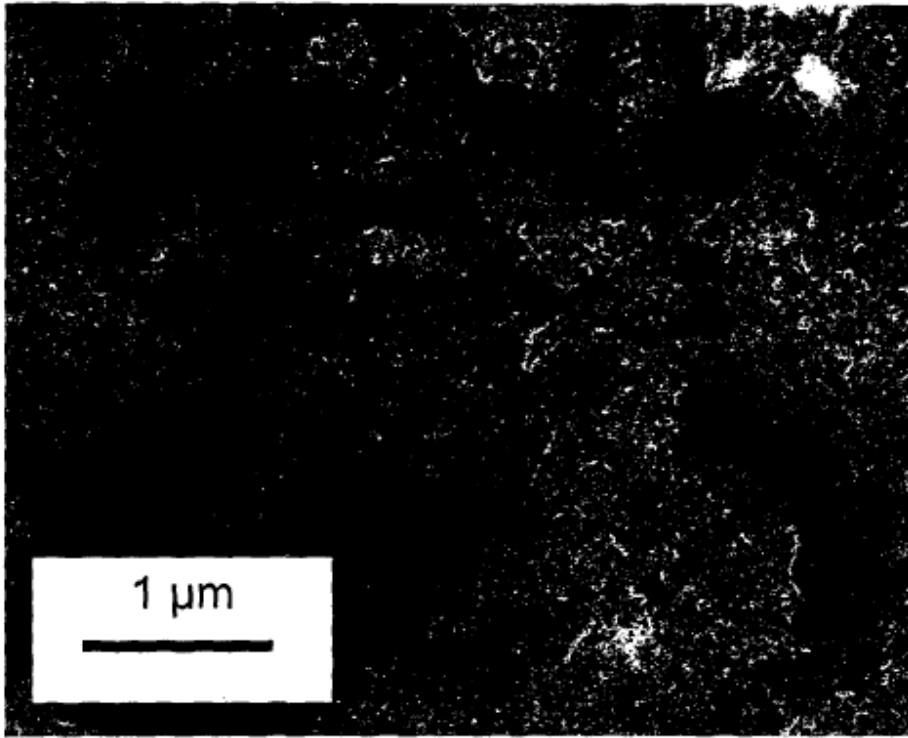


Fig. 4



Fig. 5