

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 779**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2009** **PCT/FR2009/000748**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010** **WO10007229**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2009** **E 09797556 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2307064**

54 Título: **Biomateriales basados en fosfato de calcio**

30 Prioridad:

23.06.2008 FR 0803493

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR y

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NICE
(50.0%)**

72 Inventor/es:

BALAGUER, THIERRY;

ROCHET, NATHALIE y

CARLE, GEORGES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 779 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

Biomateriales basados en fosfato de calcio

- 5 La invención tiene como objeto un nuevo biomaterial basado en fosfato de calcio, especialmente basado en hidroxiapatito o basado en un material que comprende hidroxiapatito tal como fosfatos de calcio bifásicos y cementos fosfocálcicos, un procedimiento para su preparación y su uso para la fabricación de un implante o para la colocación de una prótesis para permitir la regeneración de tejido óseo.
- 10 La reconstrucción de las pérdidas de sustancia ósea, de origen principalmente traumático y más raramente tumoral, es una de las grandes dificultades encontradas por los cirujanos ortopédicos. Los defectos de pequeño tamaño, desde la pseudoartrosis "fija" (defecto de consolidación de una fractura en que la pérdida de sustancia es virtual) hasta pérdidas óseas de 5-6 cm son, lo más a menudo, el objeto de un injerto autólogo de tejido óseo esponjoso o corticoesponjoso extraído de la cresta ilíaca (patrón de referencia). Los defectos de gran tamaño (≥ 6 cm) necesitan
- 15 intervenciones mucho más importantes, transferencias óseas vascularizadas o el procedimiento de Masquelet. A pesar de todo, la cantidad de hueso autólogo disponible está limitada, la consolidación ósea sigue siendo aleatoria y estas diferentes técnicas son fuertes generadoras de complicaciones posoperatorias al nivel del sitio de extracción del injerto.
- 20 Los diferentes biomateriales disponibles en la práctica clínica permiten evitar, en teoría, los inconvenientes del injerto autólogo. Desgraciadamente, ninguno de ellos iguala los resultados del injerto óseo y no permiten nunca la reconstrucción de pérdidas de sustancia de gran tamaño.
- 25 La mayoría de materiales estudiados actualmente asocian a los biomateriales citoblastos mesenquimáticos obtenidos a partir de médula ósea después de varias semanas de selección y cultivo celular *in vitro*. Este enfoque es laborioso y costoso, lo que limita los beneficios clínicos.
- 30 Es conocido que la sangre coagulada favorece la reconstrucción ósea. L. Okazaki et al., Clin. Oral Impl. Res., 16, 2005, 236-243 describe implantes basados en polvo de hueso desmineralizado o de sangre coagulada. El documento WO 02/068010 describe un material compuesto basado en médula ósea, comprendiendo este material una matriz implantable biocompatible y porosa y un material coagulado, tal como un coagulado de médula ósea, sangre y plasma.
- 35 Tales materiales, resultantes de la asociación de un soporte y de sangre coagulada o no, se han usado hasta el momento en cirugía maxilofacial en que los problemas de consolidación ósea son poco importantes, pero se han usado poco o nada en la reparación de huesos diafisarios.
- 40 Los procedimientos de fabricación de estos implantes necesitan extraer sangre de un donante, lo más a menudo el destinatario del implante, y requieren a continuación etapas de manipulación del soporte (hueso desmineralizado o polímero de síntesis o cerámica), especialmente etapas de mezclado con sangre, que son fuentes de contaminación del biomaterial. Además, es difícil obtener un biomaterial homogéneo mediante estos procedimientos.
- 45 Persiste por tanto la necesidad de un procedimiento de preparación de un biomaterial implantable a partir de un soporte de síntesis, por tanto fácil de producir, con propiedades constantes y homogéneas, permitiendo obtener este procedimiento propiedades superiores en términos de biocompatibilidad, y permitiendo la reconstrucción rápida de un tejido óseo de calidad, sin que sea necesario recurrir a etapas de cultivo o de extracción.
- 50 La invención permite remediar los inconvenientes de la técnica anterior y permite la obtención de un hueso de excelente calidad en términos de duración y vascularización. Además, el procedimiento de fabricación de este biomaterial es sencillo, fácil de poner en práctica, no necesita múltiples intervenciones en el individuo para tratar y es poco costoso comparativamente a los procedimientos de la técnica anterior.
- 55 El hidroxiapatito entra en la composición de numerosos materiales de reconstrucción ósea. El hidroxiapatito puede emplearse solo en esta aplicación o en mezcla con otros componentes como es el caso por ejemplo de fosfato de calcio bifásico, o en cementos fosfocálcicos.
- 60 El fosfato de calcio bifásico, FCB, se usa en numerosas aplicaciones médicas y dentales. El fosfato de calcio bifásico se describió por primera vez como material de reparación ósea por Nery et al., J Periodontol. 1992 Sep; 63(9): 729-35. El FCB está constituido por una mezcla de hidroxiapatito (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y fosfato tricálcico beta ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (β -FTC). Su bioactividad y su bioabsorbilidad pueden controlarse por la proporción de hidroxiapatito y β -FTC que lo constituyen.
- 65 El documento US-2005/0226939 describe un procedimiento de fabricación de nanopartículas de hidroxiapatito, consistiendo este procedimiento en el mezclado de una composición basada en iones de calcio y de iones fosfato y un tratamiento por microondas. Las condiciones empleadas en este documento no conducen a la formación de

hidroxiapatito o FCB impregnado por una solución de cloruro de calcio.

Los biomateriales basados en FCB tienen la ventaja, con relación a otros biomateriales de síntesis, de favorecer la osteogénesis.

5 El FCB ha sido objeto de numerosos estudios: Lerouxel et al. *Biomaterials*, 2006, Sept. 27(26): 4566-72, 18, 287-294; Malard O. et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 46(1), 1999, 103; Mankani M.H. et al., *Biotechnology and Bioengineering*, 72(1), 2001, 96-107. Estos diferentes autores han generado observaciones relativas a la influencia del tamaño de las partículas de FCB. En el documento Mankani M.H. et al., el procedimiento consiste en el
10 mezclado de partículas de HA/FCB con células y entonces fibrinógeno, y trombina reconstituida en una disolución de CaCl_2 . Pero la disolución de CaCl_2 es más concentrada que la usada en la invención y la relación molar/peso de CaCl_2 /FCB es superior a la empleada en los biomateriales de la invención.

Trojani C. et al., *Biomaterials*, 27, 2006, 3256-3264, mostraron que podía obtener una buena osteoinducción por la implantación de un material compuesto de FCB/hidrogel de Si-hidroxiopropilmetilcelulosa al que se hayan
15 implantado células de médula ósea, con partículas de FCB calibradas de 40 a 80 μm . Estos últimos procedimientos requieren sin embargo una etapa de extracción de células de médula ósea así como su puesta en cultivo.

El documento WO 2006/015275 describe un procedimiento que favorece la regeneración ósea, comprendiendo este procedimiento la preparación de una composición constituida por un material de soporte basado en fosfato de calcio,
20 un plasma rico en plaquetas, calcio y un activador del receptor PAR distinto de trombina. Pero la concentración de CaCl_2 en estas composiciones es tan elevada que actuaría, si se pusiera en práctica en las condiciones de la presente invención, como anticoagulante.

Los dos componentes del FCB, HA y β -FTC, representan los dos tipos principales de fosfatos de calcio usados en
25 cirugía ósea y dental. Son notablemente biocompatibles y se considera que su asociación presenta una mejor bioactividad y por tanto una mayor eficacia que el HA solo o el β -FTC solo. En efecto, en los FCB, los dos componentes (HA y β -FTC) presentan sinergia de acción:

El hidroxiapatito, desde su implantación *in vivo* y por su estructura química, puede promover en su superficie la
30 formación de apatito fosfocálcico no estequiométricamente polisustituido (denominados "apatitos biológicos") por crecimiento epitáxico. Esta capa de apatito biológico, muy cercana a los cristales presentes en la matriz ósea, facilitaría la adhesión y actividad celulares.

El β -FTC, mucho más soluble que el HA, mantiene una sobresaturación en calcio y fosfatos de los fluidos biológicos
35 que rodean el implante de FCB. Esto permite mantener el fenómeno de precipitación de apatito biológico sobre la fase de HA. Además, esta fase es mucho más absorbible que el HA, es por tanto posible modular la absorbibilidad del implante haciendo variar la relación de HA/ β -FTC.

Estos fenómenos químicos se han mostrado *in vitro* (J.M. Boulter, G. Daculsi, *Key Engineering Materials* 2001; 192-195:119-122; Yamada S, et al., *Biomaterials* 1997; 18: 1037-41; S. Yamada et al., *J. Biomed. Mater. Res* 1997; 37: 346-52) e *in vivo* (Daculsi G, et al., *J Biomed Mater Res* 1989; 23: 883-94; G. Daculsi et al. *Int. Rev. Cytol* 1997; 129-191). Estos mecanismos parecen participar en la mejor eficacia clínica de los FCB con relación a los materiales
40 monofásicos de HA o FTC (Nery EB et al., *J Periodontol* 1992; 63: 729-35 ; Ellinger RF et al., *Int J Periodontics Restorative Dent* 1986; 6: 22-33; Passuti N. et al., *Clin Orthop Relat Res* 1989; (248): 169-76; Gouin F et al., *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 1995; 81: 59-65; Ransford AO et al., *J Bone Joint Surg Br* 1998; 80: 13-8; R. Cavagna et al., *J. Long-Term effect of Med. Impl* 1999; 9: 403-412).

La presente invención se apoya en la comprobación de que ciertos fosfatos de calcio, en particular apatitos
50 fosfocálcicos como el hidroxiapatito, inhiben la coagulación espontánea de la sangre total cuando se ponen en contacto. Efectivamente, se ha comprobado que el HA, y también el FCB que contiene HA, inhiben la coagulación espontánea de sangre total cuando se ponen en contacto. Se ha comprobado también que si se impregnan previamente hidroxiapatito o FCB con suero fisiológico (que es una fase acuosa de NaCl), como se recomienda en los manuales de uso de estos biomateriales, la sangre puesta en contacto a continuación no coagula.

55 Se detallan en la parte experimental las condiciones experimentales que permiten establecer las propiedades anticoagulantes de un material de soporte.

La invención tiene como primer objeto un procedimiento de preparación de un biomaterial implantable que consiste en un soporte basado en al menos un fosfato de calcio tal como hidroxiapatito o una mezcla de hidroxiapatito y al
60 menos otro material, consistiendo este procedimiento en al menos una etapa de impregnación del soporte con al menos un agente coagulante.

Se entiende por soporte basado en fosfatos de calcio un material que comprende al menos un constituyente de tipo apatito fosfocálcico elegido entre: hidroxiapatito, fluoroapatito, apatitos no estequiométricos polisustituidos (ANEPS)
65 así como sus mezclas con otros biomateriales fosfocálcicos. Tales soportes pueden estar constituidos por

hidroxiapatito, FCB, ANEPS y cementos fosfocálcicos apatíticos.

El soporte así impregnado se implanta a continuación en el sitio donde debe complementarse un defecto óseo. Su implantación provoca entonces la coagulación de la sangre que entra en contacto con el biomaterial o que penetra en el biomaterial *in situ*. En los ensayos que se han realizado con FCB, se ha comprobado que el FCB, asociado a sangre coagulada, permite obtener una buena osteogénesis y conduce a un tejido óseo de calidad muy satisfactoria mediante un procedimiento muy sencillo comparativamente a los de la técnica anterior. Sin impregnación del FCB por una disolución de agente coagulante, no se obtiene osteogénesis.

Según una variante de la invención, el soporte basado en fosfato de calcio, especialmente basado en hidroxiapatito o una mezcla de hidroxiapatito y otro material, se implanta en el sitio donde debe complementarse un defecto óseo y entonces se impregna *in situ* con una disolución de agente coagulante.

Preferiblemente, el soporte usado en la invención está basado en hidroxiapatito, fluoroapatito, apatitos no estequiométricos polisustituídos (ANEPS) o una mezcla de uno de estos componentes con al menos otro biomaterial tal como fosfato tricálcico en forma $\alpha\beta$ ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato dicálcico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato dicálcico anhidro (CaHPO_4), fosfato monocálcico monohidratado ($\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato tetracálcico ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) y fosfato octocálcico ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$). Ventajosamente, el soporte está basado en hidroxiapatito o FCB, preferiblemente está basado en FCB.

El soporte, y especialmente el apatito o FCB que pueden usarse en la invención, puede ser de cualquier forma: o bien en forma de monolito o bien en forma de gránulos, calibrados o no.

El FCB que puede usarse en la invención consiste en una frita a alta temperatura. Cuando está en forma de gránulos, se tritura y calibra, por ejemplo por tamizado, en función del diámetro elegido. De forma ventajosa, el FCB que puede usarse en la invención consiste en hidroxiapatito y fosfato tricálcico β a una relación en peso/peso de HA/ β -FTC comprendida entre 5/95 y 95/5, preferiblemente entre 30/70 y 80/20, ventajosamente entre 40/60 y 60/40.

Ventajosamente, se trata de un soporte, y en particular de un FCB poroso, con tamaños de poro que van de 50 nm a 1000 μm , ventajosamente de 500 nm a 100 μm y más ventajosamente de 1 μm a 50 μm .

Cuando el soporte, y en particular en FCB, usado en la presente invención está en forma de gránulos, presenta ventajosamente una granulometría comprendida entre 40 y 500 μm , preferiblemente entre 40 y 400 μm , aún más preferiblemente entre 40 y 300 μm , y ventajosamente entre 80 y 200 μm .

Los gránulos o el polvo de FCB pueden obtenerse de acuerdo con los métodos descritos por Bouler et al., J Biomed Mater Res, 1996, 32, 603-609; Bouler et al., J Biomed Mater Res, 2000, 51, 680-684; Obadia et al., J Biomed Mater Res, 2006, 80(B), 32-42.

El FCB puede obtenerse comercialmente en la compañía GRAFTYS SARL (Aix en Provence).

El hidroxiapatito que puede usarse en la invención está preferiblemente en forma de gránulos. Está disponible comercialmente en la compañía GRAFTYS SARL.

Más particularmente, la invención se refiere a un biomaterial que comprende un soporte basado en fosfato de calcio, impregnado con una disolución de al menos un agente coagulante derivado del calcio, estando elegido el soporte entre: hidroxiapatito y un FCB, estando el agente coagulante en forma de una disolución acuosa de una concentración que va de 1 a 50 mmol/l, siendo la proporción de disolución de agente coagulante y de HA o FCB de 0,5 a 5 en volumen/volumen de la disolución de agente coagulante con respecto al volumen de HA o FCB.

Preferiblemente, la invención se refiere a un biomaterial que comprende un soporte basado en fosfato de calcio, impregnado con una disolución de al menos un agente coagulante derivado del calcio, eligiéndose el soporte entre: hidroxiapatito y un FCB, estando presente el agente coagulante derivado del calcio en proporción que va de 2,5 a 60 μmol de calcio por gramo de HA o FCB, y preferiblemente de 5 a 40 μmol de calcio por gramo de HA o FCB.

El agente coagulante es un agente coagulante basado en calcio, tal como una sal de calcio biocompatible como por ejemplo: CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{AcOEt})_2$, CaSO_4 .

Ventajosamente, el agente coagulante está basado en calcio y se elige entre las sales de calcio biocompatibles, ventajosamente CaCl_2 . Para permitir la impregnación del soporte, en particular de HA o FCB, por el agente coagulante, este último se usa en disolución acuosa, ventajosamente en disolución acuosa de una concentración que va de 1 a 50 mmol/l, preferiblemente de 3 a 40 mmol/l, ventajosamente de 5 a 20 mmol/l. Estos valores son particularmente preferidos en el caso en que el agente coagulante sea una sal de calcio y especialmente CaCl_2 .

La proporción de disolución de agente coagulante y HA o FCB puesta en práctica en el procedimiento de la

invención es de 0,5 a 5 en volumen/volumen de disolución de agente coagulante con relación al peso de HA o FCB, preferiblemente de 1 a 3, ventajosamente de aproximadamente 2.

Según otra variante de la invención, el biomaterial se prepara de forma extemporánea por impregnación del soporte basado en fosfato de calcio justo antes de su implantación.

Se puede considerar también preparar el biomaterial de la invención aplicando el procedimiento siguiente: impregnar el soporte basado en fosfatos de calcio con una disolución de agente coagulante y entonces secarlo o liofilizarlo y entonces acondicionarlo en condiciones estériles y conservarlo hasta su implantación.

Ventajosamente, la duración de la impregnación es de 1 minuto a 1 hora, preferiblemente de 1 a 30 minutos, ventajosamente de 5 a 15 minutos.

Según otra variante de la invención, se puede preparar un biomaterial de la invención impregnando el soporte basado en fosfato de calcio con una disolución de agente coagulante y entonces se acondiciona este biomaterial en condiciones estériles y se conserva así hasta su implantación.

Según una variante de la invención, se puede considerar que el biomaterial de soporte (basado en fosfato de calcio) está asociado al agente coagulante en forma de polvo. En particular, se puede mezclar un biomaterial tal como FCB o HA en forma de polvo o de gránulos con una sal de calcio en forma de polvo sólido. Este biomaterial puede almacenarse así hasta su uso e impregnarse con una disolución acuosa, como por ejemplo suero fisiológico, de forma extemporánea, justo antes de su implantación, en el momento de su uso. Puede implantarse también en forma seca, no impregnada.

Según la invención, se puede considerar que se añadan al soporte, y especialmente al FCB, uno o varios aditivos eventuales tales como: polímeros, partículas de cerámicas, moléculas farmacéuticas o agentes bioactivos, siendo la condiciones para el empleo de estos materiales: su biocompatibilidad, la ausencia de efecto negativo sobre la reacción de coagulación sanguínea. Si uno de estos aditivos tenía un efecto desfavorable sobre la coagulación sanguínea, este debería tenerse en cuenta en la cantidad de agente coagulante para poner en práctica. Por ejemplo, tales aditivos o agentes activos pueden emplearse por injerto del soporte, FCB u otro, por mezclado o impregnación o por revestimiento. Tales aditivos bien conocidos por el especialista en la materia están destinados a modificar la reología del biomaterial, su comportamiento *in vivo* (dureza, resorción, osteogénesis) o a actuar sobre la aparición de infecciones o de fenómenos inflamatorios (antibióticos, agentes antiinfecciosos, agentes antiinflamatorios).

Se puede considerar también introducir en el biomaterial de la invención una o varias moléculas terapéuticas como moléculas destinadas a prevenir o tratar una patología elegida por ejemplo entre: un cáncer u osteoporosis.

Se puede considerar también introducir en el biomaterial de la invención tejido adiposo, o cualquier otra preparación de tejido o de células, extraída del paciente al que está destinado el biomaterial, habiéndose puesto en suspensión previamente este tejido adiposo o esta preparación en sangre o plasma o suero fisiológico.

Se pueden igualmente introducir en el biomaterial de la invención factores de crecimiento, naturales o de síntesis. Se puede considerar también la presencia de biomarcadores o de agentes de contraste que favorezcan la visualización por imagenología médica de la resorción del biomaterial y su futuro en el organismo.

Según el procedimiento de la invención, se coloca el soporte, y especialmente HA o FCB, en una cavidad de un recipiente cerrado y estéril. Cuando el soporte está en forma de gránulos, se puede colocar por ejemplo en la cavidad interior de una jeringa. Se introduce la cantidad apropiada de agente coagulante en este recipiente, por ejemplo por aspiración con la ayuda de la jeringa si se usa tal dispositivo.

En el caso en que el soporte, y particularmente HA o FCB, esté en forma de monolito, este se coloca en un recipiente de forma y dimensiones apropiadas.

En todos los casos, se considera el volumen del recipiente para permitir la introducción de la cantidad querida de disolución de agente coagulante.

El recipiente cerrado que contiene el soporte, especialmente HA o FCB, y el agente coagulante puede agitarse, de forma que se permita la impregnación homogénea del biomaterial. Pero también se puede considerar una impregnación pasiva del soporte por el agente coagulante.

Al término de esta etapa, el biomaterial está en forma:

- de una pasta líquida homogénea, cuando el soporte se ha empleado en forma de gránulos,
- de un monolito cuyas cavidades se llenan de líquido, cuando el soporte se ha empleado en forma de monolito.

Según una variante de la invención, se puede considerar implantar directamente el material de soporte en el espacio para rellenar, eventualmente en mezcla con el agente coagulante en forma de polvo, y entonces impregnarlo *in situ*, o bien por la disolución de agente coagulante, o bien cuando está ya en mezcla con el agente coagulante, con una disolución acuosa adaptada tal como suero fisiológico. Se puede considerar también implantar, cuando está en forma de mezcla seca con el agente coagulante, sin impregnar, y dejarlo impregnar por la sangre de los tejidos circundantes.

Es otro objeto de la invención un biomaterial que consta de un soporte basado en fosfato de calcio tal como hidroxiapatito o un FCB, impregnado con una disolución de al menos un agente coagulante, tal como se describe anteriormente.

Según la forma física del soporte, HA o FCB, y el tipo de dispositivo que se haya empleado para la preparación del biomaterial de la invención, este puede aplicarse a continuación con la ayuda de los medios más adaptados para la ubicación donde deba rellenarse un defecto óseo:

Con la ayuda de una herramienta tal como una espátula, o con la ayuda de una jeringa cuyo extremo consiste en una abertura adaptada a la reología y al tamaño de las partículas de biomaterial de la invención. Puede implantarse también directamente en forma de un monolito. En este último caso, este se habrá concebido o dimensionado para que su forma y sus dimensiones correspondan a las del espacio para rellenar.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de relleno de un defecto óseo, constando este procedimiento de las etapas enumeradas anteriormente y constando además de una etapa de inserción del biomaterial en el espacio donde se ha comprobado un defecto óseo. Este procedimiento puede comprender además etapas de incisión del tejido y de sutura.

Según el tamaño y la configuración del defecto óseo, el relleno por biomaterial de la invención puede asociarse a la colocación de una osteosíntesis provisional que permita conferir al tejido afectado la resistencia mecánica necesaria mientras que se produce la reconstrucción ósea sobre el sitio de implantación del biomaterial de la invención.

Como comprobaron los inventores, la implantación del biomaterial de la invención permitía favorecer la formación de tejido óseo en plazos cortos (varias semanas), estando este tejido óseo muy ricamente vascularizado.

Otro objeto de la invención está constituido por un kit para la puesta en práctica del procedimiento de la invención, comprendiendo este kit la asociación de un soporte basado en fosfato de calcio como hidroxiapatito o una mezcla de hidroxiapatito y al menos otro material, como por ejemplo un FCB microporoso, con un agente coagulante derivado del calcio. Ventajosamente, el agente coagulante es una sal de calcio biocompatible, como CaCl_2 .

Se calcula la cantidad de agente coagulante para compensar el efecto anticoagulante del fosfato de calcio, y en particular del hidroxiapatito, y favorecer la coagulación sanguínea de los tejidos circundantes.

Tal asociación puede estar en forma de un kit que consta de:

- (a) un dispositivo estéril que consta de una cavidad interior estéril en la que se coloca el soporte, como por ejemplo FCB o HA,
- (b) un depósito estéril que consta del agente coagulante.

El depósito (b) puede formar parte del dispositivo (a) o ser una entidad distinta tal como un tubo o un matraz en el que se puede extraer el agente coagulante para transferirlo a la cavidad interior del dispositivo (a), o una jeringa que permita la inyección del agente coagulante en la cavidad donde se coloca el soporte.

La cavidad interior del dispositivo (a) es de un tamaño que permita introducir la cantidad de agente coagulante necesaria para producir el biomaterial de la invención, así como los demás constituyentes de la mezcla tales como por ejemplo principios activos.

De forma ventajosa, el dispositivo (a) consta igualmente de los medios que permiten la aplicación del biomaterial en la zona donde se ha comprobado un defecto óseo.

Tal dispositivo puede estar constituido por una jeringa.

Se puede considerar igualmente usar un dispositivo tal como el descrito en el documento WO 02/068010, que consta de un tubo en el interior del cual se conserva el soporte, especialmente FCB, en el que se inyecta el agente coagulante y en que puede verse adaptar un pistón para restituir el biomaterial una vez que se forma este.

Un biomaterial según la invención puede usarse para la fabricación de un implante óseo, se trate de rellenar una

fractura, una pérdida de sustancia de origen traumático o tumoral, un defecto consecuencia de una intervención quirúrgica o para ayudar a la colocación de una prótesis.

El biomaterial puede introducirse mediante una intervención quirúrgica en la zona donde debe rellenarse un defecto óseo. Después de la incisión, se implanta el biomaterial y se cierra la incisión.

El biomaterial de la invención puede asociarse a una osteosíntesis de forma que permita la consolidación provisional a la espera de la estabilización de la zona deficiente por tejidos óseos.

Un revestimiento de la prótesis con el biomaterial de la invención permite favorecer la implantación de tejido óseo vivo en o alrededor de la prótesis.

El biomaterial de la invención puede usarse también *in vitro* o *ex-vivo* como soporte para la producción de tejido óseo:

Efectivamente, el cultivo de células óseas alrededor de este biomaterial permite producir un tejido óseo posteriormente implantable.

Es otro objeto de la invención el uso *in vitro* o *ex-vivo* de un biomaterial tal como se describe anteriormente para producir un implante óseo.

Se puede, según la invención, cultivar células óseas sobre el biomaterial de la invención en un molde que tenga la forma de la prótesis que se desea fabricar. El cultivo de células en estas condiciones permite obtener una prótesis biocompatible de forma y dimensiones adaptadas.

FIGURAS

Figuras 1A a 1D: Preparación de implantes y procedimiento quirúrgico.

Figura 2: Ilustración gráfica de la concentración de calcio de un plasma en contacto con biomateriales de fosfato de calcio.

Figura 3A: Fotografía del producto obtenido por la adición de una disolución de cloruro de calcio a FCB y HA antes de la adición de sangre.

Figura 3B: Fotografía del producto obtenido por la adición de una disolución de cloruro de calcio a concentraciones crecientes sobre FCB.

Figura 4: Análisis por microscopio electrónico de barrido de implantes constituidos por sangre total extraída sin anticoagulante (A, C) y micropartículas de FCB (80-200 μm), o implantes preparados según el protocolo habitual (B, D). En los implantes preparados sin calcio, se señala la ausencia de formación de red de fibrina y de coágulo sanguíneo alrededor de los granos (A, C). La flecha blanca (C) indica varios glóbulos rojos depositados sobre los granos. Escalas A, B: 100 μm , C, D: 10 μm .

PARTE EXPERIMENTAL

I- Efecto de FCB y HA sobre la coagulación:

1. Principio:

Se trata de un procedimiento extemporáneo, realizado en quirófano. Consiste en mezclar en el cuerpo de una jeringa de polipropileno partículas de FCB y un agente coagulante: CaCl_2 . La implantación de este biomaterial en el sitio donde se ha comprobado un defecto óseo favorece la coagulación alrededor del biomaterial.

2. Materiales y métodos

2.1. Partículas de fosfato de calcio bifásico:

El biomaterial de fosfato de calcio bifásico (FCB) está compuesto por 60 % de hidroxiapatito (HA; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) y 40 % de fosfato tricálcico (FTC; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Se han proporcionado las partículas de FCB calibradas entre 40 y 200 micrómetros por la compañía GRAFTYS SARL (Aix-en-Provence, Francia). Se han esterilizado las partículas por calentamiento a 180 °C durante dos horas.

2.2. Medida de la concentración de calcio en el plasma de murido:

Se ha medido la concentración de calcio en el plasma de ratón C57BL/6 (Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia). Se ha preparado este plasma a partir de sangre extraída con heparina, por centrifugación a 1800 g durante 15 minutos. Se usa la heparina como anticoagulante que no modifica la concentración de calcio del plasma. Se ha realizado el análisis en un autómata Hitachi (Orléans, Francia).

2.3. Preparación de implantes y procedimientos quirúrgicos:

Como se ilustra en las figuras 1A a 1D, se usa una jeringa (1) que consta de un cuerpo (2) cilíndrico hueco en el que se desplaza un pistón (3). En el extremo del cuerpo (2) que no está taponado por el pistón, el cuerpo de la jeringa está taponado por un tapón de filtro (4). En el cuerpo (2) de la jeringa, entre el extremo (5) del pistón y el tapón de filtro (4), se encuentran los gránulos (6) de FCB (Figura 1A). Se ha esterilizado el conjunto anteriormente a su empleo. Se coloca el extremo de la jeringa que porta el tapón de filtro (4) en un recipiente (7) relleno de disolución (8) acuosa de CaCl_2 a una concentración del 1 %. El movimiento hacia atrás del pistón (3) permite aspirar la disolución (8) en el interior del cuerpo (2) de la jeringa (1) (Figura 1B). Se deja el conjunto en reposo durante 10 min con el fin de que las partículas de FCB se impregnen de la disolución, y después con la ayuda del pistón (3) se expulsa la disolución (8) de CaCl_2 en exceso a través del tapón de filtro (4) (Figura 1C). Se retira el filtro (9) del tapón de filtro y una presión sobre el pistón (3) permite depositar los gránulos (6) de FCB impregnados de disolución (8) sobre el sitio quirúrgico (10) (Figura 1D). Se cierra a continuación el sitio de implantación (etapa no representada).

3. Resultados

3.1. Efecto de hidroxiapatito y FTC sobre la coagulación:

Se han colocado 50 mg de polvo de HA o de polvo de FTC en el cuerpo de una jeringa de 1 ml. Se han añadido 100 μl de sangre en cada jeringa que contiene o bien HA o bien FTC. Se ha colocado esta mezcla sobre una rueda giratoria que permite mantener el polvo en suspensión en la sangre durante el tiempo de coagulación, concretamente 10 minutos. En cada experimento, una jeringa que contenía 100 μl de sangre total tratada como las demás, concretamente 10 minutos sobre la rueda giratoria, servía como control positivo de la coagulación. Después de 10 minutos, se detiene la rueda giratoria, se recuperan las jeringas, se corta su punta y se extrae la mezcla de sangre/polvo empujando con el pistón de la jeringa. No se observa coagulación de la sangre alrededor del polvo. Se ha repetido cada experimento 3 veces.

Se observó que, en presencia de 50 mg de HA y 100 μl de sangre total, se ha inhibido la coagulación. La sangre sigue líquida.

Testigo: control positivo de coagulación. Se observa un coágulo y un exudado de suero.

En presencia de 50 mg de FTC + 100 μl de sangre, tenía lugar coagulación, se traduce en la formación de un implante en el que la red de fibrina mantiene el polvo en suspensión de forma homogénea.

Se ha realizado el mismo experimento habiendo añadido cloruro de calcio en la jeringa que contiene HA anteriormente a la introducción de sangre: se encuentra coagulación y formación de un implante.

3.2. Efecto del FCB sobre la coagulación.

Se observa que la sangre recién extraída (100 μl) en ausencia de anticoagulante e inmediatamente mezclada con partículas de FCB (50 mg) no coagula. Este efecto anticoagulante se anula por la adición de CaCl_2 (20 μl de una disolución de CaCl_2 al 1 %), sugiriendo la captación de calcio plasmático por el FCB. Esta hipótesis se ha confirmado por la medida de la concentración de calcio en el plasma antes y después del contacto con FCB. Para ello, se ha preparado plasma a partir de sangre de ratón C57BL/6 extraída con heparina (anticoagulante que no modifica la concentración plasmática de calcio.). En presencia de FCB, se observa una caída de la concentración de calcio plasmático de $2,06 \pm 0,06 \text{ mmol/l}$ (valor normal) a $0,59 \pm 0,07 \text{ mmol/l}$ en presencia de FCB.

II- Efecto de los biomateriales basados en fosfatos de calcio sobre la concentración de calcio plasmático

1. Principio:

Se han puesto alícuotas de 50 mg de micropartículas de FCB (60/40), alícuotas de 50 mg de HA o de β -FTC en presencia o bien de 50 μl de H_2O o bien de 50 μl de una disolución 2,5 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y se han puesto a secar durante una noche a 56 °C. Se han depositado estos materiales en los pocillos de una microplaca de 96 pocillos. En cada pocillo, se han añadido 100 μl de plasma preparado a partir de sangre de ratón C57BL/6 extraída con heparina, anticoagulante que no interfiere con la tasa de calcio. Después de 15 minutos de incubación, se ha centrifugado la placa durante 2 minutos a 800 g y se han extraído los sobrenadantes con el fin de valorar la concentración de calcio del plasma. Se ha realizado la valoración del calcio usando el kit de ensayo de calcio QuantiChrom (CENTAUR, Bruselas, Bélgica) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se han puesto alícuotas de 5 μl de sobrenadante en presencia de 200 μl de una disolución de fenilsulfonaftaleína, colorante que forma un complejo estable de color azul en presencia de calcio libre. Después de incubación durante 3 minutos, se obtiene una intensidad de coloración medida a 612 nm que es directamente proporcional a la concentración de calcio de la muestra. En cada placa, se realizó una escala patrón a partir de las concentraciones siguientes de calcio 0 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 3 - 4 - 5 mM.

2. Resultados:

Se comprobó (Figura 2) que el FCB en forma de micropartículas, así como el polvo de HA, puestos en contacto con plasma, inducían una disminución importante y significativa de su concentración de calcio. La caída de la concentración de calcio es similar para FCB y HA y no se observa para β -FTC. A partir de los valores obtenidos para plasma solo ($1,960 \pm 0,044$ mM), plasma en presencia de FCB ($0,871 \pm 0,160$ mM) y plasma en presencia de HA ($0,840 \pm 0,121$ mM), se evaluó la captación de calcio en $0,125$ μ mol de calcio por 50 mg de FCB o HA.

Se comprobó igualmente que la adición de 50 μ l de una disolución $2,5$ M (o bien $0,125$ μ mol) al FCB o HA antes de añadir el plasma permitía restaurar una concentración plasmática de calcio normal (Figura 2). La misma cantidad de cloruro de calcio añadida a β -FTC se añade al calcio plasmático inicial y confirma la ausencia de captación por este biomaterial en estas condiciones.

Por otro lado, se observó que la captación de calcio era idéntica para las tres granulosis de FCB ensayadas, es decir para las micropartículas de 40 - 80 μ m, 80 - 200 μ m y las de 200 - 500 μ m.

Además, se obtuvieron los mismos resultados de compensación por adición de calcio si la disolución de cloruro de calcio se añade extemporáneamente en forma líquida justo antes de añadir el plasma o si esta disolución se seca antes del contacto con las partículas.

III- Efecto de la adición de calcio sobre las propiedades anticoagulantes de FCB y HA

1. Principio:

Con el fin de demostrar que existía un vínculo de causa y efecto entre la inhibición de la coagulación y la caída del calcio plasmático inducida por FCB y HA, se realizaron ensayos de coagulación en alícuotas de 50 mg de micropartículas de FCB ($60/40$) y 50 mg de polvo de HA, después de añadir 50 μ l de NaCl 150 mM o 50 μ l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $2,5$ mM.

2. Resultados:

Después de añadir sangre no tratada con un anticoagulante y rotación durante 15 minutos, se comprobó (Figura 3A) que la adición previa de calcio a FCB y HA permitía restablecer la coagulación de la sangre puesta en presencia de estos dos biomateriales.

Estos resultados demuestran que el efecto anticoagulante de FCB y HA está muy ligado a la disminución de la concentración de calcio plasmático que inducen estos dos biomateriales, y que la adición de calcio permite restablecer la coagulación.

Se analizó el efecto de una dosis de respuesta de calcio sobre la coagulación de la sangre puesta en contacto con el FCB (Figura 3B). Se ha preparado el biomaterial añadiendo 100 μ l de sangre total sin adición de anticoagulante a 50 mg de partículas de FCB en presencia de un volumen fijo de 50 μ l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, preparado a concentraciones de $0,01$ % ($0,68$ mM)- $0,02$ % ($1,36$ mM)- $0,05$ % ($3,4$ mM)- $0,1$ % ($6,8$ mM)- $0,2$ % ($13,6$ mM)- $0,5$ % (34 mM)- 1 % (68 mM)- 10 % (680 mM) o del mismo volumen de NaCl 150 mM. Después de incubación durante 15 minutos sobre una rueda giratoria, se desmoldea el biomaterial. Se comprobó que a baja concentración, correspondiente aquí a $0,01$ y $0,02$ %, el calcio añadido no permitía restablecer la coagulación. En presencia de concentraciones comprendidas entre $0,05$ y $0,5$ %, se observa coagulación. Sorprendentemente, se comprobó que el aumento de la concentración de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1 % y más allá inducía de nuevo la inhibición de la coagulación (Figura 3B y tabla 1).

Estos experimentos permitieron determinar las concentraciones óptimas de calcio que permitían bloquear el efecto anticoagulante de FCB $60/40$ y mostraron que existe una horquilla de concentración muy importante que respetar.

IV. Análisis de la red de fibrina por microscopía electrónica de barrido

El efecto anticoagulante de FCB, visualizado por la ausencia de formación de implantes gelificados cohesivos en el transcurso de los ensayos descritos anteriormente, corresponde a nivel molecular a la inhibición de la formación de la red de fibrina que forma la estructura del coágulo. Se analizó la presencia de la red de fibrina por microscopio electrónico de barrido. Para ello, se prepararon implantes mezclando 100 μ l de sangre sin adición de anticoagulante con 50 mg de FCB o 50 mg de FCB incubado en presencia de calcio y después secado. Después de 15 minutos de rotación sobre una rueda giratoria, se desmoldean las mezclas y se sumergen directamente en una disolución de fijación al $1,6$ % de glutaraldehído en tampón fosfato $0,1$ M pH 7 . Se lavan a continuación las muestras, se deshidratan por baños de alcohol a concentraciones crecientes, se sumergen en hexametildisilazano (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, Francia) durante 5 minutos y se secan a temperatura ambiente. Después del montaje sobre

soportes de aluminio y recubrimiento con oro sobre paladio durante 4 minutos (Polaron, A5100, RU), se realiza el análisis con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido (JEOL 6700F, Japón).

- 5 Como se ve en la figura 4, en las condiciones de FCB no se observó red de fibrina (Figuras 4A, 4C) entre las micropartículas de FCB. La presencia de algunos glóbulos rojos depositados sobre los granos acredita el mezclado de partículas con la sangre. Por el contrario, en presencia de FCB/calcio se comprueba la presencia de un coágulo que encierra las partículas, coágulo visualizado por mallas de la red de fibrina y un muy gran número de glóbulos rojos (Figuras 4B, 4D).

10

Tabla 1

Concentración de la disolución de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ añadida a la mezcla de FCB y sangre (en % y en molaridad)	Número de μmoles de calcio aportados por 50 μl de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Prueba de coagulación de 50 mg de FCB + 100 μl de sangre + 50 ml de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (líquido o seco)
0		-
0,01 % (0,68 mM)	0,034	-
0,02 %	0,068	+
0,03 %	0,102	+
0,04 %	0,136	+
0,05 %	0,17	+
0,1 %	0,34	+
0,2 %	0,68	+
0,5 %	1,7	+
0,6 %	2,04	+
0,7 %	2,38	+
0,8 %	2,27	+
0,9 %	3,06	+
1 % (68 mM)	3,4	+/-
2 %		-
10 % (680 mM)	34	-

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un biomaterial que comprende un soporte basado en fosfato de calcio, caracterizado porque:
 - el soporte se elige entre hidroxiapatito y un FCB, preferiblemente un FCB, y
 - porque dicho soporte está impregnado con al menos un agente coagulante derivado del calcio, preferiblemente CaCl_2 , en forma de una disolución acuosa de una concentración que va de 1 a 50 mmol/l, preferiblemente de 3 a 40 mmol/l, ventajosamente de 5 a 20 mmol/l,siendo la proporción de disolución de agente coagulante e hidroxiapatito o FCB de 0,5 a 5, preferiblemente de 1 a 3 en volumen de la disolución de agente coagulante con relación al volumen de hidroxiapatito o FCB.
2. Biomaterial que comprende un soporte basado en fosfato de calcio, impregnado con una disolución de al menos un agente coagulante derivado del calcio, caracterizado porque el soporte se elige entre hidroxiapatito y un FCB, y porque el agente coagulante derivado del calcio está presente en una proporción que va de 2,5 a 60 μmol de calcio por gramo de hidroxiapatito o FCB, y preferiblemente de 5 a 40 μmol de calcio por gramo de hidroxiapatito o FCB.
3. Biomaterial que comprende un soporte basado en fosfato de calcio, asociado a al menos un agente coagulante derivado del calcio en forma de polvo, caracterizado porque el soporte se elige entre hidroxiapatito y un FCB, y porque el agente coagulante derivado del calcio está presente en una proporción que va de 2,5 a 60 μmol de calcio por gramo de hidroxiapatito o FCB, y preferiblemente de 5 a 40 μmol de calcio por gramo de hidroxiapatito o FCB.
4. Biomaterial según la reivindicación 2 o según la reivindicación 3, en el que el agente coagulante es CaCl_2 .
5. Biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el soporte está en forma de monolito.
6. Biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el soporte está en forma de gránulos.
7. Biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, y que comprende además al menos un aditivo elegido entre: polímeros, partículas de cerámicas, moléculas farmacéuticas, factores de crecimiento, naturales o de síntesis, biomarcadores, agentes de contraste, una preparación de tejido o de células.
8. Biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 u obtenido según la reivindicación 1 para uso como implante en un procedimiento de relleno de un defecto óseo.
9. Asociación de un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 u obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1 con una osteosíntesis.
10. Kit para la puesta en práctica del procedimiento de fabricación de un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7 u obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1, comprendiendo este kit
 - un soporte basado en hidroxiapatito o FCB, y
 - un agente coagulante derivado del calcio, en forma de una disolución acuosa de concentración que va de 1 a 50 mmol/l y la proporción de disolución de agente coagulante e hidroxiapatito o FCB es de 0,5 a 5 en volumen/volumen de disolución de agente coagulante con relación al volumen de hidroxiapatito o FCB.
11. Kit para la puesta en práctica de un procedimiento de fabricación de un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, comprendiendo este kit
 - un soporte basado en hidroxiapatito o FCB, y
 - un agente coagulante derivado del calcio en forma de polvo.
12. Kit según la reivindicación 10 u 11, que consta de:
 - a) un dispositivo estéril que consta de una cavidad interior estéril en la que se coloca el soporte,
 - b) un depósito estéril que consta del agente coagulante.
13. Kit según la reivindicación 12 en el que el dispositivo (a) contiene medios que permiten la aplicación del biomaterial en la zona donde se ha comprobado un defecto óseo.
14. Kit según la reivindicación 12 o 13, en el que el dispositivo (a) está constituido por una jeringa.

- 15.** Uso de un biomaterial según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 u obtenido según el procedimiento de la reivindicación 1, *in vitro* o *ex-vivo*, como soporte para la producción de tejido óseo, o para producir un implante óseo.

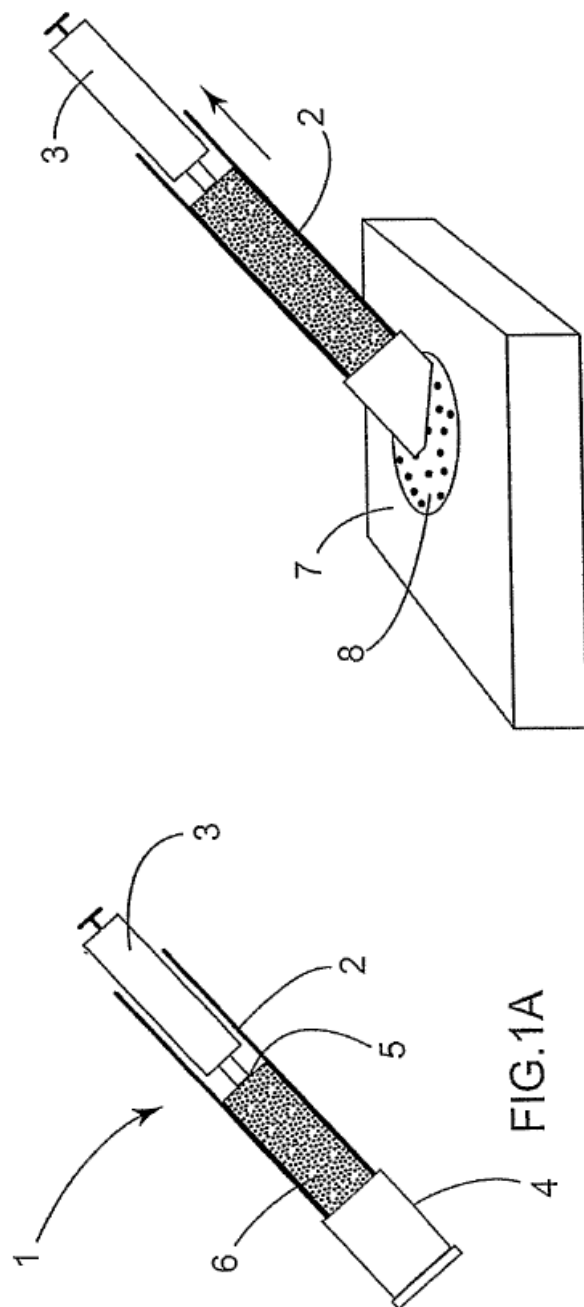


FIG.1B

FIG.1A

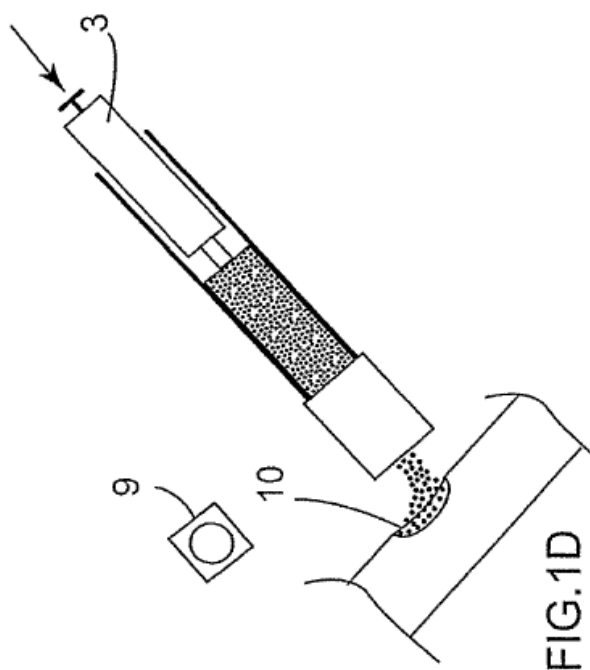
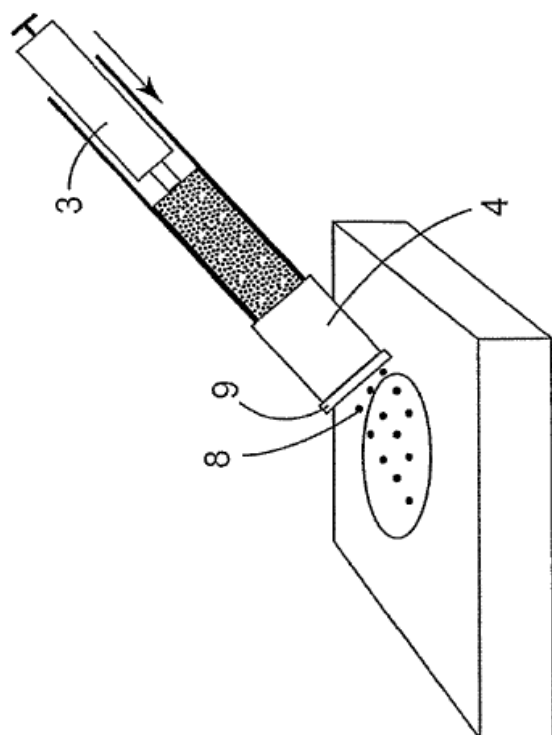
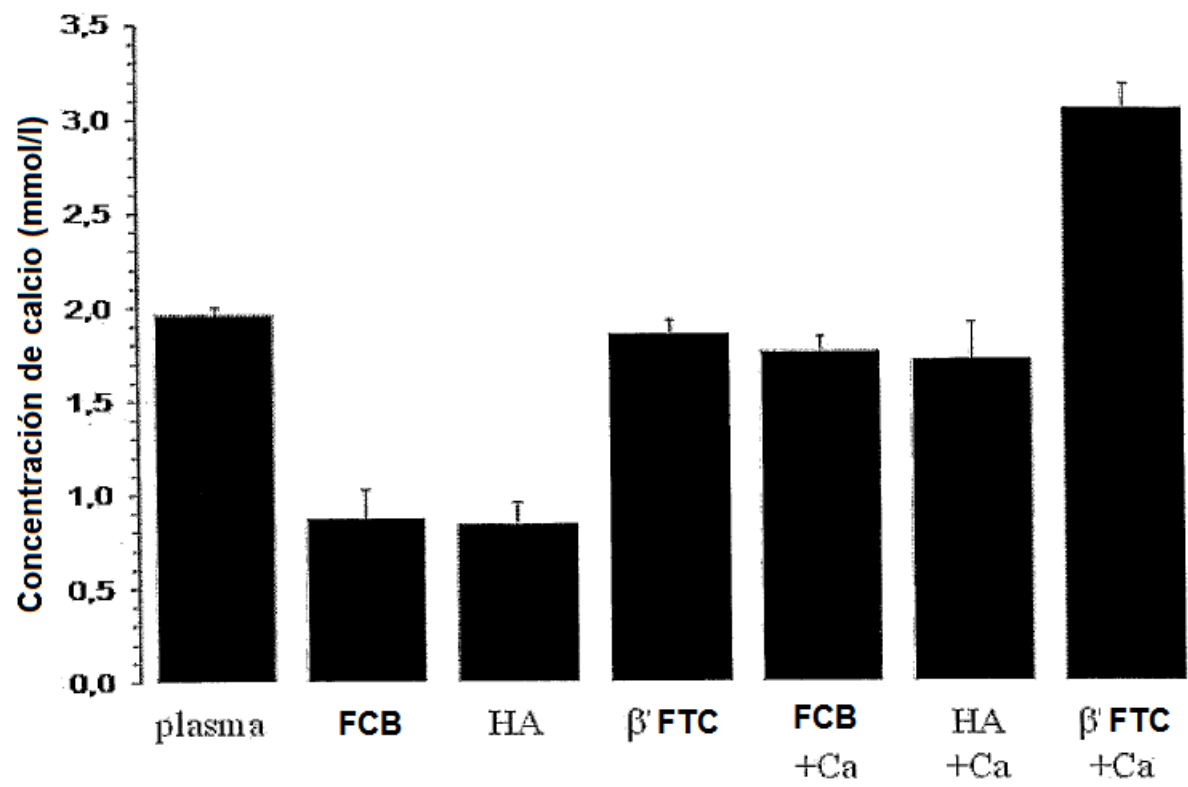


Figura 2



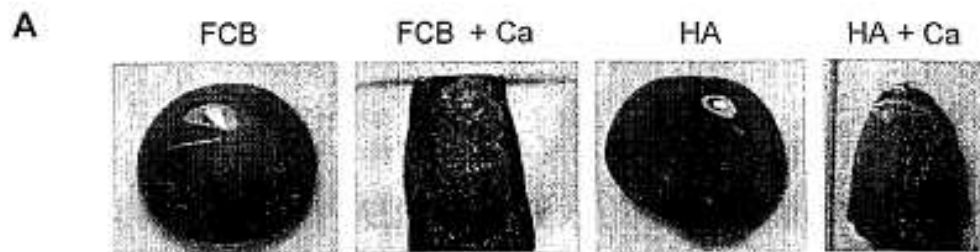


Figura 3A

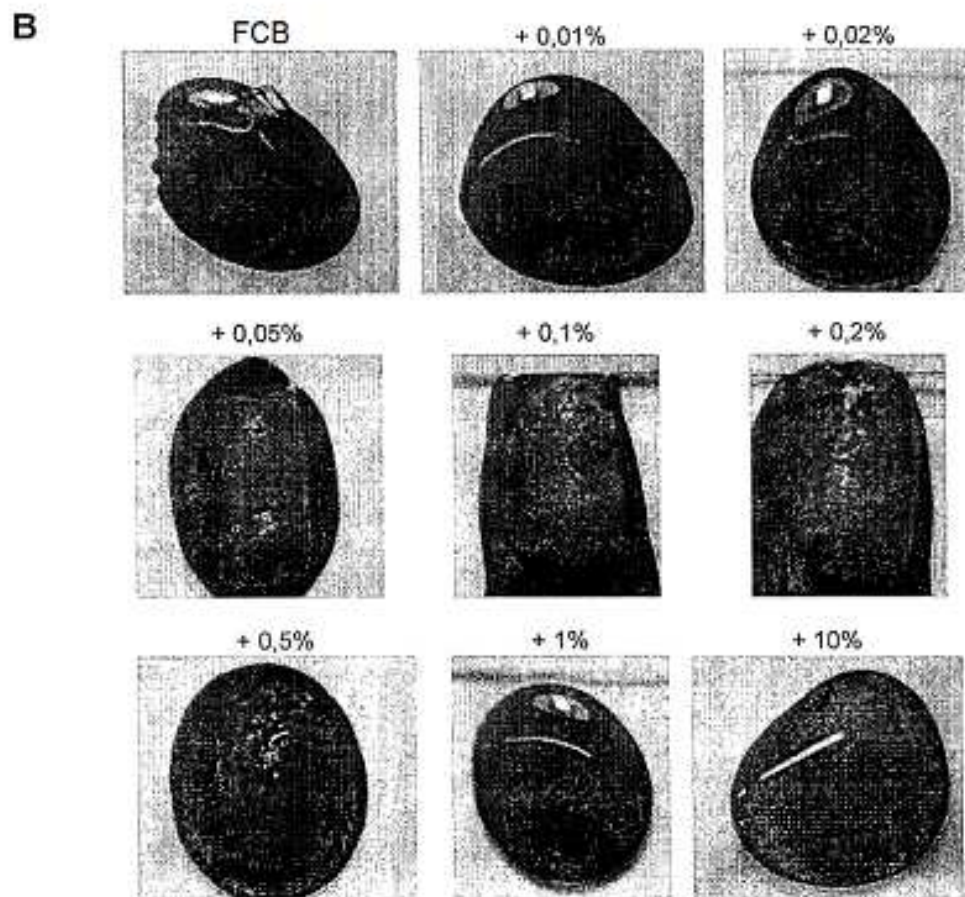


Figura 3B

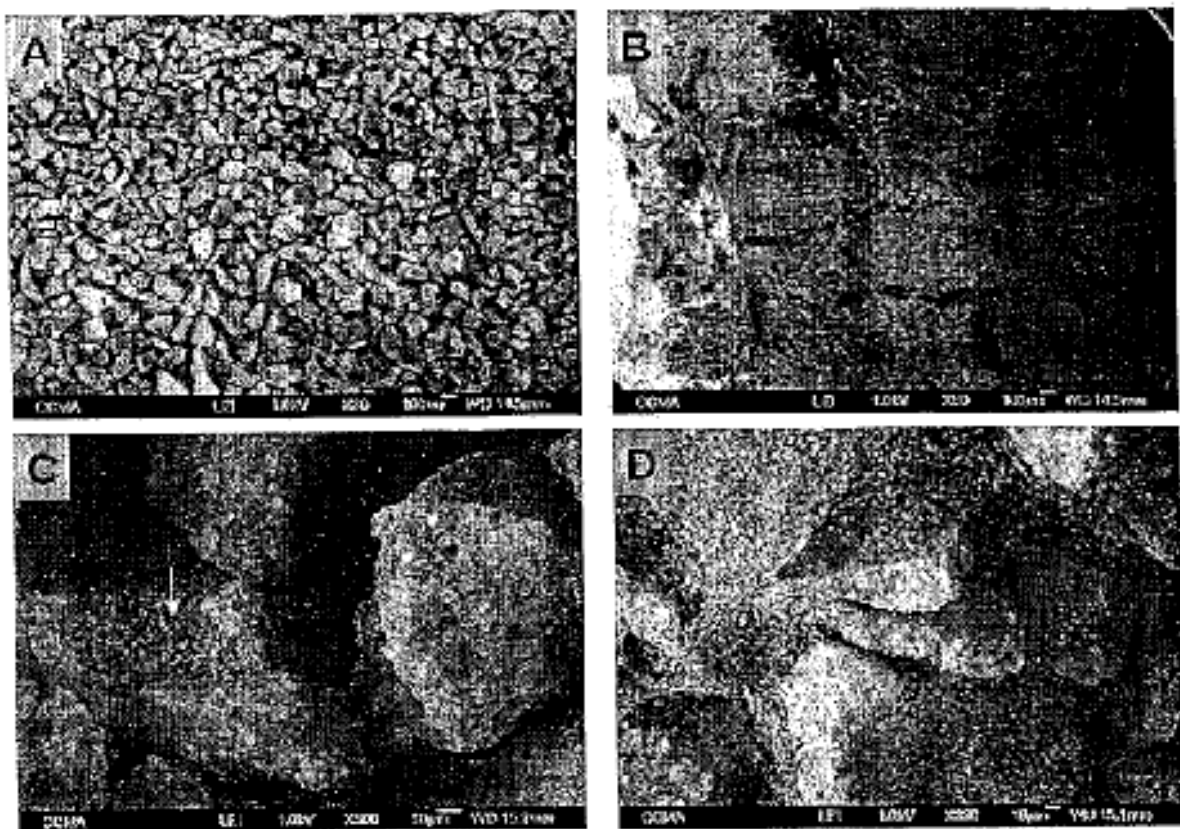


Figura 4