

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 806**

51 Int. Cl.:

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2010 E 10159575 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2269663**

54 Título: **Injerto óseo y material biocompuesto**

30 Prioridad:

03.07.2009 EP 09164607

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

18.06.2018

73 Titular/es:

**ARMBRUSTER BIOTECHNOLOGY GMBH
(100.0%)
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, DE**

72 Inventor/es:

**ARMBRUSTER, FRANZ PAUL, DR. y
BRIANT, ROLF, DR.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 672 806 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

Injerto óseo y material biocompuesto

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a injertos óseos y a materiales biocompuestos hechos de un material base que comprende gránulos de fosfato tricálcico y un polímero o copolímero reabsorbible. La invención se refiere, en particular, a composiciones para acelerar y mejorar la curación de lesiones óseas y de partes blandas en el curso de la odontología protésica.

Antecedentes de la invención

La estabilidad de los implantes óseos depende en gran medida de sus propiedades de increscencia. Para que los implantes dentales funcionen, debe haber suficiente hueso en la mandíbula, y el hueso tiene que ser lo suficientemente fuerte como para sostener y apoyar el implante. Cuando no hay suficiente hueso maxilar o mandibular o es inadecuado en términos de profundidad o espesor, se usan injertos en odontología protésica para proporcionar una integración segura con el implante dental. Los injertos convencionales incluyen el propio hueso del paciente (autoinjertos), hueso procesado de cadáver (aloinjertos); hueso de bovino o coral (xenoinjertos); y materiales sintéticos similares a huesos o miméticos óseos.

En un procedimiento típico, el dentista o cirujano oral crea un gran colgajo de la gingiva o encía para dejar al descubierto la mandíbula en el sitio del injerto, instala algunos tipos de injertos de bloque y de recubrimiento dentro y encima del hueso existente y, finalmente, toma medidas para repeler infecciones no deseadas. A continuación, se sutura la gingiva sobre el sitio, y se deja cicatrizar el sitio del injerto de varias semanas o meses. La curación implica una cascada complicada de respuestas celulares adaptativas tales como la diferenciación, la migración, la unión, la proliferación, la síntesis de matriz extracelular y, finalmente, mineralización. La osteointegración del injerto o implante en el hueso circundante es, sin embargo, poco conocida. La osteoinducción y la osteogénesis implican una gran cantidad de factores de crecimiento, y hay numerosas moléculas adicionales que se dice que contribuyen a estos procesos.

Las proteínas morfogénicas óseas (BMP) son los únicos factores de crecimiento que se sabe que inducen la formación ósea heterotópicamente. Las dosis suplementarias de BMP aumentan la curación ósea induciendo a las células mesenquimales indiferenciadas a diferenciarse en osteoblastos. Los injertos e implantes óseos, sin embargo, darán lugar a un hueso vascular vivo que es muy parecido al natural. El documento US-A 5 478 237 (Ishikawa) desvela un implante recubierto con una capa de hidroxiapatita; el documento WO 02/078759 (Stratec Medical AG), un implante que tiene una capa de un óxido de metal poroso que comprende fosfato de calcio amorfo y nanocristalino e hidroxiapatita; el documento WO 02/085250 (KERAMED GmbH), un implante en el que un recubrimiento de fases de fosfato de calcio reabsorbible contiene proteínas de adhesión y señalización tales como la sialoproteína ósea (BSP), proteína morfogénica ósea (BMP), fibronectina, osteopontina (OPN), ICAM-1, VCAM y derivados de las mismas. Otros injertos e implantes de este tipo se describen en el documento EP 1 166 804 A2 (Merck, Darmstadt) y el documento WO 99/08730 (Children's Medical Center Corporation). El documento DE 100 37 850 A1 (Jenissen H) y el documento WO 03/059407 A1 (Straumann Holding AG) describen injertos e implantes tratados con ubiquitina o factor de crecimiento transformante (TGF) u hormonas sistémicas tales como osteostatina, osteogénesis y péptido de osteocrecimiento (OGP). El documento US 7.229.545 B2 (Biomet Deutschland GmbH) enseña recubrimientos de análogos óseos hechos de una matriz de colágeno mineralizada con fosfato de calcio; el documento EP 1 442 755 A1 (Depuy Products), un recubrimiento cerámico bioactivo que comprende proteínas osteogénicas OP-1, BMP-7 y proteínas de la matriz ósea no colagenosas. Además se ha informado de actividades osteogénicas para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de insulina (IGF) y miembros de la familia de los anteriores.

El documento WO 2005/104988 (Armbruster *et al.*) reivindica implantes y matrices de reparación ósea tratadas con una rBSP infraglicosilada humana. Los implantes están hechos de titanio, circonio, cerámica, aleaciones de metales o acero inoxidable, y pueden estar recubiertos con hidroxiapatita amorfa o cristalina y/o fosfato de calcio. Sin embargo, dichos recubrimientos miméticos óseos adolecen de la desventaja de tender a soltarse del sustrato con el tiempo, lo que afecta a la estabilidad a largo plazo de los implantes. El documento EP 1 084 719 describe una composición inyectable para mejorar el crecimiento del hueso. La composición comprende un componente bioactivo que comprende BSP pura y un componente de vehículo de entrega que comprende polímero biodegradable y sal mineral tal como fosfato tricálcico.

El documento WO 03/047646 (Inion Ltd., Tampere, Finlandia) enseña injertos de hueso que se pueden formar en implantes médicos. El injerto o implante está hecho de un material base que comprende una matriz de polímeros o copolímeros reabsorbibles, y *N*-metil-2-pirrolidona (NMP). Reichhardt *et al* describen, en *European Cells and Materials* 2006, 11 (2): 27f, un material biocompuesto que comprende gránulos de fosfato de betatricalcio (TCP beta) recubiertos con un copolímero de ácido poliglicólico y poliláctico. El material biocompuesto se puede hacer

moldeable para su colocación mezclándolo con *N*-metil-pirrolidona. Nair *et al* desvelan, en *J. Biomater. Appl.* 2006, 20: 307-24, injertos e implantes dentales en los que los gránulos de TCP beta se mantienen unidos mediante la fusión térmica de un copolímero de ácido poliglicólico-poliláctico. Las partículas de TCP beta se describen como inhibidoras de la diferenciación y la proliferación de células madre mesenquimales en osteoblastos y la curación ósea. Wang *et al.* describen, en *J. Orth. Res.*, 2002, 20: 1175ff, dicho tipo de inhibición también para partículas de abrasión metálicas, así como para zonas trabajadas y grandes áreas superficiales.

El documento US 6.458.763 (Peterson *et al.*) reivindica una composición bioactiva para la reparación del hueso y cartílago dañado o enfermo. La composición bioactiva se administra a través de un vehículo de entrega que comprende una base farmacéuticamente aceptable y cargas minerales fisiológicas tales como fosfato tricálcico, hidroxiapatita, yeso y similares. Cuando se perfora un orificio en la calvaria de rata en o adyacente a la eminencia parietal, y se bombea la composición bioactiva al sitio del defecto calvarial durante un período de 14 días usando una bomba osmótica, luego se observa una inducción *in vivo* de crecimiento del tejido óseo alrededor del orificio perforado. Es evidente que el método de administración y la composición no son adecuados para la odontología protésica.

El documento WO 94/13310 (Hook *et al.*) reivindica una composición que comprende como principio activo un péptido competidor que parece combatir la fijación de *Staphylococcus aureus* al tejido óseo, así como la osteomielitis (Ryden *et al.*, 1989, *Eur. J. Biochem.*184: 331f).

La técnica anterior representa, no obstante, un problema, pues los implantes dentales suelen dar lugar a una afección periodontal denominada perimplantitis causada por una infección introducida durante la cirugía o por el no seguimiento por parte del paciente de las rutinas correctas de higiene oral. Aunque la implantitis se puede tratar por un curso de antibióticos y enjuagues orales especiales en los días previos y posteriores a la cirugía, un tratamiento preventivo de la perimplantitis, así como una mejor curación de la herida y de los tejidos blandos sería más deseable. El aflojamiento aséptico, las reacciones inflamatorias y la estabilidad a largo plazo de los implantes endoóseos siguen siendo un problema. A pesar de los recubrimientos bioactivos, todavía hay un considerable período de tiempo entre la cirugía y la osteointegración hasta la que los injertos óseos e implantes dentales endoóseos pueden soportar la presión, la cizalla y las fuerzas de tracción típicas.

En particular, es un objeto de la presente invención proporcionar un material de injerto que permita una colocación fácil, así como composiciones para promover la curación de las lesiones óseas y de partes blandas en el curso de la odontología protésica.

Sumario de la invención

Este objeto se ha conseguido mediante un material biocompuesto como el reivindicado en las reivindicaciones 1 y 3. En las reivindicaciones dependientes, se desvelan realizaciones adicionales de la invención.

El injerto óseo de la invención para el tratamiento de defectos óseos y la neogénesis ósea es un material compuesto de un polímero biodegradable y gránulos de fosfato tricálcico beta y obtenido mediante las etapas de:

proporcionar una mezcla osteoinductora, que es una dispersión o solución a base de un compuesto orgánico que tiene al menos un grupo no reactivo básico que contiene nitrógeno, que tiene un valor de pKa de 2 a 14, compuesto orgánico que es tanto un agente dispersante como un plastificante del polímero o copolímero biodegradable y que puede formar una sal que tiene una pKl de 4,0, y de una cantidad fisiológicamente eficaz de BSP humana recombinante activa obtenida en condiciones no desnaturalizantes, donde la BSP humana recombinante está presente en dicha mezcla osteoinductora en forma de sal o complejo que tiene afinidad reducida por el calcio, la hidroxiapatita y el factor H del complemento en comparación con la BSP humana normal presente en suero humano, y, opcionalmente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable; proporcionar una mezcla osteoconductora a base de gránulos de difosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en forma de cristal beta, gránulos que están recubiertos con un polímero o copolímero biodegradable y, opcionalmente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, mezcla osteoconductora que es moldeable y conformable, y que se endurece rápidamente *in situ* cuando se coloca mediante cirugía u odontología protésica; y combinar dichas mezclas osteoinductora y osteoconductora poco antes o durante la colocación para obtenerse un material de injerto óseo que fomente la reparación ósea, y la curación de tejidos dañados y enfermos, y de lesiones.

En un segundo aspecto de la invención, la BSP humana osteoinductora es BSP humana infraglicosilada expresada y obtenida a partir de células eucariotas cultivadas en condiciones exentas de suero.

En un tercer aspecto de la invención, la BSP humana infraglicosilada se ha obtenido a partir del calostro o leche materna.

El compuesto orgánico usado en la presente invención es preferentemente aquel que tiene al menos un grupo básico que contiene nitrógeno en el anillo. Dicho compuesto orgánico puede ser preferentemente tanto un agente

dispersante como un plastificante del polímero o copolímero biodegradable, y puede seleccionarse del grupo que consiste en *N*-isopropilpirrolidona, *N*-metilpirimidina, *N*-etilpirimidina, *N*-metilpirrolidona(1-metil-2-pirrolidona), *N*-etilpirrolidona, *N*-propilpirrolidona, *N,N*-dietil-1,4-butanodiamina, 1-(2-aminoetil)-piperazina, 2-(1-pirrolidil)etilamina, 4-amino-2-metoxi-pirimidina, 2-dimetilaminoetanol, 1-(2-hidroxi)etil-piperazina, 4-(2-hidroxi)etil-morfolina, 2-mercaptopirimidina, 2-mercaptobencimidazol, *N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina, 4-(2-aminoetil)-piridina, 2-amino-6-metoxibenzotiazol, 4-(aminoetil)piridina, *N,N*-dialilmelamina, 3-amino-1,2,4-triazol, 1-(3-aminopropil)-imidazol, 4-(2-hidroxi)etil-piridina, 1-(2-hidroxi)etil-imidazol, 3-mercapto-1,2,4-triazol.

En un aspecto adicional de la invención, dichos polímeros o copolímeros biodegradables se seleccionan de grupo que consiste en poliglicólido, poli(L-láctido-co-glicólido), poli(D,L-láctido-co-glicólido), poli(L-láctido), poli(D,L-láctido), poli(L-láctido-co-D,L-láctido), policaprolactona, poli(L-láctido-co-caprolactona), poli(D,L-láctido-co-caprolactona), politrimetilencarbonatos, poli(L-láctido-co-trimetilencarbonato), poli(D,L-láctido-co-trimetilencarbonato), polidioxanonas, polímeros de ácido poliláctico, polímeros de ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y ácido poliglicólico, polihidroxi)butiratos, polidioxanonas de polihidroxi)valeratos, poliortoésteres, policarbonatos, politirosincarbonatos, polialquilenoxalatos de polioxycarbonatos, succinatos de polialquileno, poli(ácido málico), poli(anhídrido maleico), polipéptidos, polidepsipéptidos, poli(alcohol vinílico), poliesteramidas, poliamidas, polianhídridos, poliuretanos, polifosfacenos, policianoacrilatos, polifumaratos, poli(aminoácidos), polisacáridos modificados, proteínas modificadas y sus copolímeros, terpolímeros o combinaciones o mezclas, o mezclas de polímeros de los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere al componente osteoconductor para su uso en odontología protésica que preferentemente puede comprender gránulos recubiertos de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) que tiene diámetros de 300 a 800 μm , preferentemente de 400 a 700 μm . El material biocompuesto de la invención puede comprender preferentemente más del 50 por ciento en volumen de gránulos de fosfato tricálcico beta, entre el 10 y 40 por ciento en volumen de una base polimérica que incluye uno o más polímeros y copolímeros biodegradables, del 0,5 al 10 por ciento en volumen de una primera mezcla osteoinductora que aumenta la plasticidad y la trabajabilidad del material biocompuesto, y como disolvente o agente de dispersión de la BSP. Dicho material compuesto puede comprender rBSP humana en una cantidad de 1 a 200 $\mu\text{g/ml}$ (p/v) de material compuesto. Preferentemente, dicha mezcla osteoinductora puede comprender rBSP humana en una cantidad de 1 a 200 $\mu\text{g/ml}$ (p/v) antes del endurecimiento.

De acuerdo con la invención, dicho polímero biodegradable puede ser un copolímero de ácido poliláctico y poliglicólico cuya composición es del 50 al 80 por ciento de ácido láctico y del 20 al 50 por ciento de ácido glicólico. Dicho copolímero de PLA:PGA puede tener un intervalo de peso molecular medio en peso seleccionado de entre aproximadamente 25.000 y aproximadamente 1.000.000. El material de injerto óseo preferentemente debe tener un módulo de Young de entre 1 GPa y aproximadamente 100 GPa tras el endurecimiento.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de preparación de un injerto óseo que tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras, que comprende las etapas de:

proporcionar una mezcla osteoinductora, que es una dispersión o una solución a base de un compuesto orgánico que tiene al menos un grupo no reactivo básico que contiene nitrógeno, que tiene un valor de pKa de 2 a 14, cuyo compuesto orgánico es tanto un agente de dispersión como un plastificante del polímero o copolímero biodegradable, y que puede formar una sal con una proteína que tenga una pK_I de 4,0 y de una cantidad fisiológicamente eficaz de BSP humana recombinante activa; proporcionar una mezcla osteoconductoras a base de gránulos de difosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en forma de cristal beta, gránulos que están recubiertos con un polímero o copolímero biodegradable; y combinar dichas mezclas osteoinductora y osteoconductoras, obteniéndose un material compuesto que es inicialmente moldeable y conformable, y que se endurece *in situ* cuando se coloque por cirugía o odontología protésica.

La invención comprende además un material de injerto óseo para su uso en la promoción de la curación de heridas y lesiones de tejidos blandos, que comprende la administración o el uso de un material biocompuesto según lo definido anteriormente. La aplicación o el uso puede comprender la formación de dicho material biocompuesto en un dispositivo de implante seleccionado del grupo que consiste en: armazones tisulares, material sustitutivo de injerto óseo granular, implantes osteocondrales bifásicos, implantes óseos que soportan peso, implantes o dispositivos de fijación que no soportan peso o que soportan poco peso, tachuelas, alfileres, tornillos, recubrimientos de hueso y películas.

Los principios de la presente invención son particularmente útiles para un implante que se compone de un cuerpo base, un conjunto espaciador compuesto de un cojinete inferior espaciador, o elemento base, y un cojinete superior espaciador, o miembro anular. El cuerpo base está provisto de un orificio interno que tiene hilos internos. El cuerpo base adyacente a un borde o extremo superior tiene un rebaje, que es de un diámetro superior al orificio, para proporcionar un tope de soporte. Para proporcionar medios para evitar la torsión axial, se proporcionan al tope de soporte bolsillos de enclavamiento del rebaje espaciados circunferencial y uniformemente, de manera que se pueda atornillar un diente de cerámica.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se describirán la presente invención, sus características y ventajas a modo meramente ilustrativo con referencia a los dibujos adjuntos, en la que:

5 La FIG. 1 es una representación esquemática de las etapas para preparar el material biocompuesto de la invención;

10 Las FIG. 2A-C son fotografías que muestran la preparación de un material biocompuesto que comprende rBSP/NMP humanas y gránulos de β -TCP recubiertos con polímero bioabsorbible;

Las FIG. 3A-B son fotografías de una colocación quirúrgica y un endurecimiento *in situ* del material biocompuesto de la invención;

15 Las FIG. 4A-D son fotografías del sitio de colocación (paciente ♀, 73 años) y de la curación de la herida 1 día después de la operación, 3 semanas después de la operación;

20 Las FIG. 4E-G son radiografías y TC 2,5 meses después de la operación y mostrando la situación antes de la implantación y de la odontología;

Las FIG. 4H-N son fotografías de una odontología ilustrativa tras la curación de la herida y la regeneración ósea;

25 Las FIG 5/01-13 son vistas microscópicas de una muestra ósea (DS64 - longitud de 1,2 cm) tomadas de un material biocompuesto de rhBSP/TCP colocado de acuerdo con la invención 12 semanas después de la cirugía - tinción de cortes histológicos de 2 a 3 micrómetros de espesor con tinte tricrómico de Masson-Goldner o azul de toluidina o hematoxilina en combinación con eosina;

30 Las FIG. 6/01-13 son vistas microscópicas de una muestra ósea (D78 - longitud de 0,5 cm) de otro implante de material biocompuesto de rhBSP/TCP, también tomadas 12 semanas después de la colocación: preparación, fijación y tinción con colorante tricrómico de Masson-Goldner o azul de toluidina o hematoxilina en combinación con eosina;

35 Las FIG. 7/01-09 son vistas microscópicas de una tercera muestra histológica (D59 - longitud de 0,6 cm) tomadas de un material biocompuesto de rhBSP/TCP 3 meses después de la cirugía - preparación, fijación y tinción con tinte tricrómico de Masson, azul de toluidina o hematoxilina en combinación con eosina.

Descripción detallada de la invención y de las realizaciones preferidas

40 En referencia a la Figura 1, el injerto óseo o material biocompuesto de la invención se obtiene mediante las etapas de a) combinar un material base (A) a base de gránulos de fosfato tricálcico beta y un polímero o copolímero biodegradable con (b) una primera composición (B), que es una dispersión o solución que comprende (i) uno o más compuestos orgánicos que tienen al menos un grupo básico que contiene nitrógeno que, en primer lugar, son un plastificante del polímero o copolímero biodegradable y que, en segundo lugar, pueden formar un sal con una proteína ácida que tenga una pKl de 4,0 e (ii) rBSP humana activa esencialmente pura; y (c), opcionalmente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable; obteniéndose (c) un material biocompuesto (C) que comprende 45 una sal de rBSP humana activa, plastificante que tiene al menos un grupo de nitrógeno básico, polímero o copolímero bioabsorbible y gránulos de TCP beta, que es moldeable y se endurece rápidamente *in situ* tras la colocación. Como se ha mencionado, el material biocompuesto (C) moldeable se puede colocar mediante cirugía o u odontología protésica, y se endurece rápidamente *in situ* tras la colocación, debido a la acción de la sangre y del agua (D). Tras el endurecimiento, el material biocompuesto endurecido (D) comprende gránulos de un armazón de fosfato tricálcico beta y una sal de rBSP humana activa embebida en un polímero o copolímero biodegradable.

55 La clave del éxito en el implante sigue siendo el proceso de curación inicial. El material de injerto óseo de la presente invención es osteoinductor y osteoconductor y, además, potencia la curación de los tejidos blandos, en particular, del tejido conjuntivo dañado y enfermo sin que se reabsorba rápidamente. En otras palabras, el material de injerto óseo es angiogénico, pero también proporciona una barrera física contra la inmigración de los fibroblastos y de las células del tejido conjuntivo, pues es posible ajustar la bioabsorción del armazón de fosfato tricálcico beta endurecido de modo que progrese en paralelo con la génesis ósea. El material biocompuesto de la invención proporciona, por tanto, a escala macroscópica, un soporte físico temprano para el implante dental y, a escala 60 microscópica, un armazón para las células del sistema óseo, así como un núcleo para la mineralización ósea. Además, potencia la angiogénesis y la curación de la herida, a la vez que inhibe la unión fibrosa.

65 El material biocompuesto moldeable de la invención tiene propiedades físicas y mecánicas inmediatamente después de la colocación, porque los gránulos de fosfato tricálcico en forma de cristal beta se han recubierto con un polímero o copolímero bioabsorbible que se endurece rápidamente cuando el plastificante contenido en el polímero bioabsorbible se diluye en los fluidos corporales circundantes (sangre, suero, agua, esputo).

Como se ha mencionado anteriormente, el componente (A) se combina primero de acuerdo con la invención con un agente plastificación para el polímero o copolímero bioabsorbible con el fin de volver el material base moldeable para y durante la colocación. El plastificante o agente dispersante (B) se selecciona de un grupo de compuestos que tienen un grupo básico que contiene nitrógeno para que también puedan funcionar como vehículo y co-iones fisiológicos para glicoproteínas ácidas tales como la rBSP humana, que tiene una pK_i de 4,0. Los plastificantes funcionan embebiéndose entre las cadenas del polímero o copolímero, separándolas y aumentando el "volumen libre", y reduciendo el punto de transición vítrea del polímero o copolímero. Los plastificantes adecuados y los co-iones fisiológicos de la invención son: *N,N*-dietil-1,4-butanodiamina, 1-(2-aminoetil)-piperazina, 2-(1-pirrolidil)etilamina, 4-amino-2-metoxi-pirimidina, 2-dimetilaminoetanol, 1-(2-hidroxietyl)-piperazina, 4-(2-hidroxietyl)-morfolina, 2-mercaptopirimidina, 2-mercaptobencimidazol. En particular, se prefieren *N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina, 4-(2-aminoetil)-piridina, 2-amino-6-metoxibenzotiazol, 4-(aminoetil)piridina, *N,N*-dialilmelamina, 3-amino-1,2,4-triazol, 1-(3-aminopropil)-imidazol, 4-(2-hidroxietyl)-piridina, 1-(2-hidroxietyl)-imidazol, 3-mercapto-1,2,4-triazol. Los compuestos adecuados se caracterizan por un grupo no reactivo básico que tiene un valor de pK_a de 2 a 14, preferentemente un valor de pK_a de 5 a 14 y lo más preferentemente de 5 a 12. El valor de pK_a se puede obtener de las tablas. Los valores límite dados anteriormente se refieren a la medición del valor de pK_a a 25 °C. El más preferido es el uso de 1-metil-2-pirrolidona (NMP = Número CAS: 872-50-4; *N*-metilpirrolidona, 1-metilpirrolidona, *N*-metil- α -pirrolidinona, 1-metilazacíclopentan-2-ona, *N*-metil- γ -butirolactona) que se conoce como potenciador de la maduración osteoblástica *in vitro*, así como la regeneración ósea *in vivo* (Miguel *et al.*, 2006, *Europ. Cells & Materials*, 11, Supl. 2:5). El mecanismo biológico subyacente de esta actividad, sin embargo, sigue sin conocerse.

El polímero bioabsorbible y biocompatible de la invención es preferentemente un copolímero ácido de poli(láctido-glicólico) PLGA o poli(ácido láctico-co-glicólico). El PLGA se sintetiza por medio de una copolimerización con apertura de anillo de los dímeros cíclicos (1,4-dioxano-2,5-dionas) del ácido glicólico y ácido láctico. Durante la polimerización, se unen entre sí sucesivas unidades monoméricas de ácido glicólico o láctico por enlaces éster, produciendo un poliéster alifático lineal como producto. Dependiendo de la proporción del láctido con respecto al glicólico usada para la polimerización, se obtienen diferentes formas de PLGA. El más preferido es PLGA 75:25, que identifica un copolímero cuya composición es 75 % de ácido láctico y 25 % de ácido glicólico. Los puntos de transición vítrea del PGLA se encuentran en el intervalo de 40 °C a 60 °C, lo que también depende de la cantidad de plastificantes o NMP presente. A diferencia de los homopolímeros de ácido láctico (poliláctido) y ácido glicólico (poliglicólico), el PLGA es disuelto por disolventes tales como tetrahidrofurano, acetona o acetato de etilo, y, por tanto, se puede aplicar fácilmente como un recubrimiento sobre un material de partículas tal como partículas de fosfato tricálcico beta.

El PLGA se degrada en presencia de agua mediante la hidrólisis de sus enlaces éster para producir los monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, que pueden entrar en diversas vías metabólicas del organismo para que no haya toxicidad sistémica asociada con el uso de PLGA para las aplicaciones de biomateriales. El tiempo necesario para la degradación del PLGA depende, en parte, de la proporción de los monómeros. El PGLA a 50:50 se degrada rápidamente *in vivo* en aproximadamente dos meses, mientras que los polímeros que se protegen terminalmente con ésteres tienen semividas de degradación más prolongadas. La diferencia en la velocidad de degradación entre los polímeros puros de ácido láctico (PLA), ácido glicólico (PGA), y las diversas proporciones de copolímeros de estas dos sustancias se han estudiado intensamente en ratas y otros mamíferos usando implantes hechos de carbono-14 y polímeros marcados con tritio. Las semividas de los diferentes polímeros y copolímeros se calcularon a partir de la radiactividad presente en el área del implante, así como en tejidos del hígado, bazo, riñón, pulmón y, por supuesto, a partir de la radiactividad presente en la orina y las heces recogidas a lo largo del experimento para cada intervalo de tiempo. La semivida de los polímeros y copolímeros disminuyó de 5 meses para el PGA al 100 % a 1 semana con el copolímero de PGA:PLA a 50:50, y aumentó rápidamente a 6,1 meses para el PLA al 100 %. No se observó ninguna diferencia en la velocidad de degradación en tejido blando ni en hueso. No se detectó radiactividad significativa en la orina, en las heces ni en otras muestras de tejido. De esos estudios, puede concluirse que se puede realizar un mejor control de la velocidad de degradación del implante variando la composición de PLA y PGA entre el 75 % y 100 % de PLA, junto con un correspondiente 25 % a 0 % de PGA. Esto proporcionaría un intervalo de semividas del implante de 2 semanas a 6 meses. Dichos polímeros biodegradables, por tanto, son los más preferidos.

Otro poliéster bioabsorbible es la policaprolactona, que se puede usar para dispositivos implantables a largo plazo, ya que su degradación es más lenta que la del PLGA. La policaprolactona (nombre comercial Resilon™) se ha investigado como un almacén para la reparación tisular y en odontología protésica para el relleno de canales radiculares. En general, el polímero biodegradable se puede seleccionar de un grupo que comprende poliglicólico, poliláctidos, policaprolactonas, politrimetilencarbonatos, polihidroxi-butaratos, polihidroxi-valeratos, polidioxanonas, poliortoésteres, policarbonatos, politirosinacarbonatos, poliortocarbonatos, oxalatos de polialquileno, succinatos de polialquileno, poli(ácido málico), poli(anhídrido maleico), polipéptidos, polidepsipéptidos, poli(alcohol vinílico), poliésteramidas, poliamidas, polianhídridos, poliuretanos, polifosfazenos, policianoacrilatos, polifumaratos, poli(aminoácidos), polisacáridos modificados, proteínas modificadas y sus copolímeros, terpolímeros, o combinaciones o mezclas o mezclas de polímeros de los mismos. La matriz del polímero preferentemente se selecciona del grupo que consiste en poliglicólico, poli (L-láctido-co-glicólico), poli (D,L-láctido-co-glicólico), poli(L-láctido), poli(D,L-láctido), poli(láctido-co-D,L-láctido), policaprolactona, poli(L-láctido-co-caprolactona),

poli(trimetilencarbonato de poli(D,L-láctido-co-caprolactona), poli(L-láctido-co-trimetilencarbonato), poli(D,L-láctido-co-trimetilencarbonato), polidioxanona y sus copolímeros, terpolímeros, o combinaciones o mezclas o mezclas de polímeros de los mismos.

5 El componente estructural osteoconductor de la invención es preferentemente el fosfato tricálcico (TCP). Si el
armazón de TCP se degrada demasiado rápido, tiene lugar la unión fibrosa a través de las aberturas sin reparación
ósea. Si hay muy pocos poros o caminos dentro del armazón, la regeneración ósea es extremadamente lenta. La
pureza del TCP influye tanto en la formación de hueso como en la biocompatibilidad, y el TCP en la forma de cristal
10 beta (TCP beta) es el más preferido como armazón. Como el armazón debería permitir la entrada de los
osteoblastos y las células mesenquimales del hospedador, se prefiere un tamaño medio de poro de
aproximadamente 200 a 400 μm de diámetro, así como poros interconectados a través de trayectorias de 100 a 200
 μm . Sin embargo, el TCP beta poroso tiene propiedades mecánicas débiles y se degrada rápidamente *in vivo*. Esto
implica propiedades mecánicas algo débiles. El TCP beta de la invención es, por tanto, preferentemente aquel
15 sinterizado a temperaturas para obtener una forma de cristal beta de fase pura para evitar la degradación rápida. De
acuerdo con la invención, el armazón, por tanto, es preferentemente de partículas finas de fase pura de TCP beta
microrrecubiertas con polímero biodegradable, y se forma para un mejor tratamiento de los gránulos de TCP
recubiertos de polímero de aproximadamente 100 a 5.000 μm , preferentemente de 200 a 700 μm para el relleno de
cavidades óseas menores, y de 500 a 1.500 μm para cavidades óseas mayores, por ejemplo, cavidades formadas
20 tras resecciones. Los gránulos de TCP beta recubiertos de polímero de tamaño muy grande se pueden usar como
armazones osteoconductores para reemplazos óseos mayores en plástico y cirugía reconservadora.

Mediante la mezcla de la rBSP humana activa con un plastificante que se incrusta en el polímero bioabsorbible con
el que se recubren los gránulos de un armazón de TCP beta, la rBSP humana activa se integra en un material
mimético óseo, en el que puede ejercer su actividad osteoinductora en un medio ambiente osteoconductor incluso
25 después del endurecimiento. Como la rBSP humana activa empleada preferentemente está infraglicosilada y
embebida en un polímero o copolímero, puede escapar mejor de la desactivación por el factor H del complemento y
formar un núcleo para la mineralización ósea. La rBSP humana se embebe además en un polímero y/o copolímero
bioabsorbible por medio del plastificante y, por lo tanto, se libera en paralelo con la bioabsorción del polímero o
copolímero bioabsorbible. En resumen, la actividad a largo plazo de la rBSP humana se obtiene mediante (i) la
30 formación de un clatrato fisiológico o sal compleja con el nitrógeno básico del plastificante; (ii) mediante su
incorporación física en el polímero o copolímero bioabsorbible que la mantiene fuera de la mineralización prematura
y la unión al factor H del complemento; e (iii) mediante su infraglicosilación, pues la rBSP humana infraglicosilada es
desactivada con menor eficacia por el factor H del complemento que la BSP humana completamente glicosilada de
células óseas regulares. Por lo tanto, la rBSP humana recombinante debe obtenerse de células cultivadas en un
35 medio sin suero. No obstante, la rBSP humana sigue siendo un núcleo *in vivo* para la mineralización ósea y la
precipitación del fosfato de calcio. La presente invención, por lo tanto, engloba una composición de injerto que
comprende rBSP humana para reparar el hueso y tejido conjuntivo dañados. Como se ha mencionado en la
introducción, la sialoproteína ósea humana es, junto con la osteocalcina y la osteonectina, la principal proteína no
colagenosa de la matriz extracelular ósea.

40 Se contempla además tener la rBSP osteoactiva unida al armazón o a la cadena principal polimérica a través de un
enlazador y marcadores enlazadores. La BSP humana no contiene, sin embargo, restos de cisteína. La BSP
humana posee un alto grado de carga negativa ($\text{pI} = 4,0$), por lo que se empleó primero una HPLC de intercambio de
aniones fuertes para aislar el complejo de BSP. El grupo básico del plastificante puede, por tanto, ejercer un efecto
45 de unión similar.

Si bien los inventores no desean estar limitados por teoría alguna, se observa que la rBSP humana ácida de la
composición de la invención tiene efectos tanto osteoinductores como biomineralizantes, y potencia la adhesión y
migración quimiotáctica de los osteoblastos y los osteoclastos hacia el material de injerto óseo. Los presentes
50 hallazgos respaldan que un clatrato o sal compleja de rBSP humana y el plastificante básico tienen actividad
sinérgica, en concreto, con respecto a la curación de tejidos blandos y heridas, cuando se compone de un polímero
o copolímero biodegradable y, opcionalmente, con un soporte o excipiente. Si bien cada componente tiene actividad
biológica, la combinación proporciona efectos angiogénicos y osteoinductores sinérgicamente útiles. La forma
galénica proporcionada se basa en una mezcla de un polímero biodegradable y gránulos de un soporte mineral que
55 se puede administrar fácilmente en el sitio de la operación en el que se necesitan las actividades angiogénicas y
osteogénicas en un entorno concertado definido. Hay una gran evidencia de que la rBSP humana no solo ayuda en
la curación de las heridas y la osteogénesis. También inhibe la inflamación y la implantitis en el curso de la cirugía
dental. El armazón de TCP del material biocompuesto de la invención finalmente proporciona una barrera mecánica
temporal contra la unión fibrosa y la increscencia endotelial, de manera que el material biocompuesto y la rBSP
60 humana puedan desarrollar completamente sus efectos osteoinductores y potenciar la regeneración ósea. El
polímero biodegradable se requiere en este sentido para embeber la rBSP humana y su liberación lenta en forma
activa.

65 *In vivo*, la expresión de BSP coincide con la mineralización ósea inicial, y se demostró que la BSP es osteoinductora
cuando se aplica como un recubrimiento en implantes femorales (OToole G. C. *et al.*, 2004, *J Orth Res* 22:641-
646). También se ha informado de efectos similares para las proteínas osteogénicas OP-1, BMP-7, otras diversas

proteínas de la matriz ósea no colagenosas, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de insulina (IGF) y miembros de la familia de los anteriores. Sin embargo, la actividad ósea de estas moléculas bioactivas es meramente especulativa, porque su actividad de osteointegración no puede medirse, *in vitro* ni *in vivo*.

5 El material biocompuesto de la invención, sin embargo, se puede colocar directamente y endurecerse en el lugar de la extracción, o donde se necesita la regeneración ósea y la curación de los tejidos blandos. En casos de extracciones menores, el material biocompuesto semiendurecido se puede cortar al nivel de la gingiva circundante de modo que se obtenga una superficie lisa con un espacio mínimo entre el tejido blando y el material de injerto óseo; véanse las Figuras 4A-C. El material de injerto óseo luego sana en uno o dos días (véase la Figura 4D), mientras que el tejido blando se adhiere al material de injerto óseo. Por consiguiente, el colgajo de dentro de la gingiva puede ser de menor tamaño, y toda la cirugía menos pesada para el paciente. En casos de implantes dentales más pequeños, ya no es necesario suturar la encía sobre el sitio de la implantación; véase la figura 4C.

15 Junto con la adhesión de los osteoclastos y los osteoblastos a la matriz ósea, la BSP participa además en la adhesión, la difusión y la orientación de las células endoteliales, así como en formación de vasos sanguíneos (Bellahcène *et al.*, 2000, *Circ.*, *Res.* 86(8), 885-91). Sin embargo, no se desea la unión fibrosa ni la increscencia endotelial en el sitio del implante en el que se necesita hueso adicional para el soporte físico del implante enossal. Esto se logra de acuerdo con la invención teniendo gránulos de TCP beta en el material biocompuesto. No obstante, la rBSP humana suprime las reacciones de inflamación y modula la liberación de las proteínas implicadas, en concreto, de interleucinas IL-6, IL-8, RANKL, osteoprotegerina (OPG), etc.

25 La invención proporciona un nuevo injerto óseo y material compuesto que potencia la diferenciación de las células madre mesenquimales a osteoblastos, induce la migración de los osteoblastos al sitio en el que se requiere la regeneración ósea, así como la proliferación de los osteoblastos y, finalmente, proporciona un núcleo para la mineralización ósea. Se han investigado numerosas proteínas por sus propiedades osteogénicas y, en concreto, el colágeno, la fibronectina, la vitronectina, así como mezclas de proteínas de matriz extracelular naturales (Sodek *et al.*, J, 2000, *Periodontol.*, 24:99-126; Meyer U *et al.*, 1998, *J Mater Sci -Mater Med* 9:301-307; Lacouture M. E. *et al.*, 2002, *J Bone Miner. Res* 17:481-492; Salih E. *et al.*, 2002, *Biochem J.* 364:465-474). En comparación con el colágeno de tipo I, la fibronectina y la vitronectina en el mantenimiento de la adhesión de los osteoblastos mecánicamente filtrados, se reveló que el factor principal que controlaba la resistencia a la tensión era el número de uniones de integrina-matriz extracelular cuando el número de moléculas disponible para la unión era limitado (Lacouture M. E. *et al.*, 2002 *J Bone Miner Res* 17,481-49220). Por lo tanto, se contempla tener también aquellas proteínas incorporadas en el material biocompuesto de la invención.

35 En la técnica anterior, no se disponía de medios para obtener mejoras fisiológicas en el proceso de curación inicial (Lekic P *et al.*, 1996, *Anat Rec* 244:50-58). Esto se debe a que cualquier área superficial grande de materiales de injerto biomiméticos conduce al retardo de la proliferación celular. Además, no había métodos ni composiciones disponibles para una administración de la BSP, de modo que pudiera ejercer sus funciones biológicas *in vivo* y no fuera desactivada por el factor H del complemento o la mineralización, mientras que la deposición de BSP representa *in vivo* la primera etapa para la formación ósea (Riminucci M *et al.*, 2003, *Braz J Med Biol Res* 36:1027-1036). Además, se descubrió que la BSP es osteoinductora en la reparación ósea y para lograr la curación en defectos críticos (Wang M. L. *et al.*, 2002, *J Orth Res* 20:1175-1184; Wang J *et al.*, 2004 *J Bone Miner. Res.* 19: 221 Sumario). Por lo tanto, se han realizado esfuerzos para inducir la expresión de la BSP mediante agentes inductores (Chou *et al.*, 2005, *Biomaterials* 26:285-29529).

50 Se puede especular que la BSP sufre algún tipo de maduración extracelular que reduce su poder de diferenciación y proliferación en las células madre mesenquimales y en los osteoblastos. Algunos grupos de investigación incluso tienen la hipótesis de que la BSP protege los trofoblastos y las células tumorales productoras de BSP del ataque del sistema inmune, ya que se une con alta afinidad al factor H del sistema del complemento, que se sabe que restringe el camino alternativo de la lisis del complemento (Fedarko *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 200, 275, 16666-16672; documento WO 00/062065). Sin embargo, está demostrado que la BSP se une específicamente *in vivo* a los receptores de la integrina a través de su secuencia de reconocimiento arginina-glicina-aspartato, RGD. Debido a la unión de la secuencia de reconocimiento RGD a los receptores de la integrina alfa(v)beta(3) y a la observación de que la adhesión, diseminación y orientación de las células endoteliales está mediada por la BSP, la BSP ocupa un papel central en los eventos de la formación de la matriz ósea y la curación de heridas. Además, la formación de vasos sanguíneos alrededor de un tumor se produce en paralelo a la expresión de BSP en las células tumorales (Bellahcène *et al.*, 2000, *Circ. Res.* 86(8):885ff). Sin embargo, la BSP "libre" es unida por el factor H del complemento con alta afinidad, de modo que cualquier BSP administrada por las composiciones de la técnica anterior no podría ejercer sus funciones fisiológicas. La molécula grande del factor H de 150 kDa se une a la BSP de menor tamaño (de aproximadamente 65 kDa) hasta el punto de que los anticuerpos o receptores no se pueden unir. Además, el factor H está presente en exceso en el suero (0,5 mg de factor H/ml en comparación con la BSP con < 20 ng/ml de suero en el caso de las personas sanas).

65 Los presentes datos indican, sin embargo, que basta con concentraciones bajas de rBSP humana infraglicosilada para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales y la unión inicial de los osteoblastos. Esto se

consigue teniendo la rBSP humana infraglicosilada integrada en un polímero biodegradable, de modo que la diferenciación y la sedimentación de las células óseas ya no sean retardadas por una gran superficie o material foráneo. Sin embargo, la rBSP humana infraglicosilada de la invención todavía es muy ácida, y reacciona y precipita con los grupos hidroxilo y el fosfato cálcico Al disolver el recubrimiento de rBSP humana infraglicosilada en un disolvente básico y un plastificante para el polímero bioabsorbible, parece que la proteína BSP se mantiene en un estado en el que puede ejercer sus funciones biológica durante más tiempo. La rBSP humana infraglicosilada se incorpora lo más preferentemente en un armazón hecho de gránulos de TCP beta cuyos poros tienen preferentemente un tamaño de diámetro de 10 a 1000 µm, más preferentemente, de 20 a 500 µm, lo más preferentemente de 50 a 200 µm. En otras palabras, se puede lograr una osteointegración mineralizada u ósea del injerto óseo cuando los osteoblastos se unen y crecen, de hecho, en los poros del material de injerto. Así pues, los poros deben tener preferentemente un tamaño de diámetro de 10 a 1.000 µm, más preferentemente, de 20 a 500 µm, lo más preferentemente, de 50 a 200 µm. La rBSP humana infraglicosilada está comprendida en la composición de la invención preferentemente a una concentración de 1 a 100 µg/ml, preferentemente de 10 a 50 µg/ml.

Los ejemplos y las realizaciones de la invención que se describen a continuación en el presente documento no se interpretarán como limitantes ni restrictivos de otra manera, sino que son de naturaleza únicamente ilustrativa. El alcance de la invención se ha definido en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Todos los procedimientos usados en los presentes experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética. Se siguieron las reglas de la Declaración de Helsinki 1964 (publicación del NIH n.º 86-23, revisada en 1985).

Ejemplo 1 - Preparación de una mezcla angiogénica con rBSP humana osteoinductora

La RBSP humana infraglicosilada se aisló de acuerdo con el método descrito por Wuttke *et al.* (Wuttke *et al.*, 2001, "Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein". *J Biol Chem* 276:36839-36848). En resumen, se amplificó el ADNc completo para la BSP humana (sin péptido señal) por medio de PCR y se clonó en el vector de expresión eucariota episomal pCEP-Pu (Kohfeldt E. *et al.*, "Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan tescican", en *FEBS Lets.* 1997, 414(3) 557-61). Las construcciones de expresión se introdujeron por medio de transfección estable mediada por liposomas en la estirpe celular de riñón embrionario EBNA-293 o células humanas de cáncer de mama MCF-7. Las células transitorias se cultivaron 48 horas después de la transfección durante dos días en medio libre de suero, de modo que las proteínas del FCS no pudieran reaccionar con la rBSP expresada ni interferir en la purificación de la BSP recombinante. Las células que expresaban BSP se cultivaron luego en condiciones sin suero. La expresión de BSP humana recombinante se controló a través de SDS-PAGE e inmunotransferencias.

Se purificaron 2,5 litros de sobrenadante de cultivo libre de suero de células transfectadas mediante una columna Sepharose™, y el rendimiento del mismo fue de 250 µg de His-myc-EK-BSP recombinante homogénea (rBSP humana). La rBSP humana estaba parcialmente glicosilada y no tenía glicosilación en la treonina 125. La secuencia de aminoácidos de rBSP humana contiene cuatro sitios de N-glicosilación en las posiciones 88 (NTT), 161 (NCT), 166 (NST) y 174 (NGS). Todas las estructuras de N-glicano identificadas se pueden encontrar en la BSP EBNA-293 recombinante. Sin embargo, hubo diferencias en la proporción porcentual de las estructuras respectivas de los N-glicanos totales. La proporción principal de los N-glicanos de BSP del hueso fue de estructuras triantenarias (58 %) y, en la estirpe celular EBNA, de estructuras tetraantenarias (48 %). Mediante espectrometría de masas MALDA-TOF, se determinaron las masas de los péptidos, y se secuenció una parte de los péptidos mediante espectrometría de masas PSD-MALDI-TOF. De éstos, las treoninas de la secuencia de rBSP humana DATPGTG están O-glicosiladas. Con la BSP aislada de huesos humanos se efectuó una tercera O-glicosilación. Con la BSP recombinante, no está presente un tercer sitio de glicosilación. Probablemente, este sitio de glicosilación se encuentra en la estructura de la parte TGLAA-BSP.

Después, se liofilizaron 250 µg de rBSP humana aislada de células cultivadas en condiciones libres de suero, y se disolvieron en 5 ml de *N*-metilpirrolidona, obteniéndose una solución básica que comprendía rBSP humana (50 µg/ml) que tenía actividad angiogénica y osteoinductora.

Ejemplo 2 - Preparación de un injerto óseo moldeable y un material biocompuesto con propiedades osteoconductoras

Como injerto óseo y material osteoconductor, se usó un material "portaespacios" Easy Graft™ comercial de DS DENTAL Degradable Solutions AG (Schlieren-Zürich, Wagistrasse, Suiza). El material biocompuesto comprendía gránulos de fosfato tricálcico puro (TCP) en la fase de cristal beta. El material de TCP se había compactado en gránulos y, en el presente ejemplo, se usó la fracción en la que los gránulos tenían diámetros de 500 µm a 630 µm, una microporosidad superior al 50 por ciento, así como un tamaño medio de poro de aproximadamente 5 µm. Para facilitar la colocación, los gránulos del material portaespacios comercial Easy Graft™ se recubren además con una capa de 10 µm de polímero de PLGA biodegradable, para poder hacer moldeable el material granuloso duro para su colocación mediante la adición de una cantidad definida de plastificante.

Ejemplo 3 - Preparación de un material biocompuesto y portaespacios que tiene propiedades osteoinductoras, osteoconductoras y angiogénicas

El material biocompuesto de la invención se preparó mediante la inmersión e impregnación de gránulos recubiertos con PLGA de TCP beta (material "portaespacios" Easy Graft™ de DS DENTAL Degradable Solutions AG, Schlieren-Zürich, Wagistrasse, Suiza) con una solución plastificante orgánica básica que comprendía *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) y 50 µg/ml de rBSP humana durante un período de 5 segundos a 1 minuto con agitación suave para que el material de TCP granular endurecido se volviera fluido y se obtuvieran *clatratos* líquidos de una sal compleja de rBSP-NMP humana multidetentada embebida dentro del recubrimiento de PLGA biodegradable. Como el PLGA biodegradable se encuentra en la superficie del material de TCP compactado, dentro de los canales y poros de TCP y más dentro de los intersticios y de las hendiduras intergranulares, los *clatratos* de la sal compleja de NMP y rBSP humana también se encerraron en el material de TCP beta granular. Por consiguiente, se obtuvo un material biocompuesto formado por gránulos de fosfato tricálcico (TCP) puro en la fase de cristal beta, un polímero de PLGA biodegradable y *clatratos* encerrados de NMP y rBSP humana biológicamente activa. El material biocompuesto fue moldeable durante la colocación y se endureció *in situ* tras la colocación por difusión del exceso de NMP en agua y sangre en 2 minutos. Los componentes del material biocompuesto se mezclaron preferentemente en una proporción en la que se esperaba que el material biocompuesto endurecido resultante comprendiera aproximadamente 20 µg de rBSP humana por mililitro de material de TCP beta/PLGA (portaespacios Easy Graft™) después del endurecimiento.

La mezcla con el material de TCP granular se realizó bien extracorporalmente mediante un dispositivo de jeringa o una ampolla (véanse las Fig. 2A, B) o, como alternativa, *in situ* una vez colocada una parte del material de TCP en el moldeo *in situ* (Fig. 2C).

Ejemplo 4 - Cirugía

Las Figuras 4A-K describen la aplicación del material biocompuesto en odontología quirúrgica y para la formación ósea. Clínicamente, los tiempos de curación y, en particular, la curación de los tejidos blandos resultaron ser un 50 % más rápidos y completos, lo que va en línea con una inhibición activa de la implantitis y con la activación de la curación de tejidos y heridas. Los tiempos de reacción en la curación de heridas se reducen a la mitad (50 %), y la generación de material óseo se duplicó, en comparación con el material Easy Graft™ normal con NMP como plastificante para el moldeo. La medición de la densidad ósea se está realizando para cuantificar la curación del tejido blando y duro acelerada por BSP/NMP. Las biopsias de los implantes (materiales biocompuestos) tomadas poco después de la implantación sugiere que el material óseo recién formado inducido por la BSP es histológicamente indistinguible de los tejidos óseos naturales, lo que confirma la rápida introducción observada de los osteoblastos y procesos de mineralización ósea naturales en línea con la regeneración acelerada observada y la curación natural de lesiones.

La figura 4A es una radiografía que muestra la situación dental y ósea de una paciente (mujer, 73 años) antes de la odontología quirúrgica. La Fig. 4B muestra la colocación de un injerto óseo moldeable (Easy Graft™) impregnado y que comprende una mezcla preformada de rBSP/NMB humana (50 µg de rBSP/NMP humana por ml de TCP/PLGA granular). Se retiró el exceso de injerto granular (se cortó) antes del endurecimiento final, y el colgajo gingival se presionó manualmente y se cerró sin sutura. Las Figuras 4C y 4D muestran la situación clínica 1 día y 3 semanas después de la operación. Cabe señalar la curación inicial acelerada de la herida, y curación en poco tiempo y de forma completa de los tejidos blandos en pacientes de edad avanzada. La Figura 4E y F son una radiografía y una TC a los 2,5 meses de la implantación que muestran el hueso recién formado en la región crestal de 1113 HU. Cabe señalar el nivel interproximal del hueso recién formado. La Figura 4G muestra cómo se colocarían los implantes dentales (tornillos). Las Figuras 4H a N muestran ejemplos de las etapas de la siguiente odontología, en concreto, de la colocación del dispositivo de posicionamiento (4H), la colocación de puntos de sangrado (4I), la compactación piezoeléctrica lateral del hueso en el sitio del implante (4K), los implantes después del posicionamiento (4L). Cabe señalar la anchura (3 mm) y la distancia interproximal para la preservación de las papilas (> 3 mm). El provisorio (4M) y la solución dental final (4N).

En particular, las Figuras 4C a 4F confirman la curación acelerada del tejido y de las heridas cuando el material de injerto de TCP granular se ha tratado con rBSP humana. Además, la Figura 4E confirma que la curación rápida de los tejidos blandos no obstaculiza ni interfiere en las propiedades osteoinductoras y osteogénicas del material de injerto óseo, y que la rBSP humana puede desempeñar y desarrollar plenamente sus actividades osteoinductoras cuando está embebida en un polímero biodegradable.

Ejemplo 5 - Examen histológico de materiales biocompuestos colocados después

Se colocaron los materiales biocompuestos de la invención tras la extracción dental y se tomaron muestras óseas 12 semanas después de la cirugía (longitudes - D68: 1,2 cm; D78: 0,5 cm; D59: 0,6 cm). Se deshidrataron núcleos de trépano, se embebieron en un material de resina polimerizable y bloques endurecidos que contenían las muestras de tejido cortadas en secciones de tejido de 2 a 3 micrómetros. Las secciones de tejido que se montan en un portaobjetos de vidrio para la tinción general con colorante tricrómico de Masson (Masson-Goldener), azul de

toluidina y hematoxilina se combinaron con eosina.

En la tinción con tricrómico de Masson: los núcleos son negros; el citoplasma es rojo/rosa; los GR son rojos; las fibras de colágeno y cartílago son azules/verdes; las fibras musculares son rojas.

5 En la tinción general con H y E (hematoxilina junto con eosina), los núcleos, los ácidos nucleicos y el retículo endoplasmático son de color azul; el citoplasma es rosa; los GR son naranjas/rojos; las fibras elásticas, las fibras reticulares y las fibras de colágeno son rosas.

10 En la tinción general con azul de toluidina, los núcleos y los ácidos nucleicos, el citoplasma, los GR y las fibras de colágeno son de color azul, y los gránulos de mastocitos son morados debido al menor pH.

En referencia a la Fig. 5, la vista general de la sección DS64 (Dünnschnitt n.º 64) de la muestra (tinción de Masson-Goldner) muestra, bajo un aumento de 10 veces, la increscencia vital del tejido óseo mientras que algún material granular foráneo (gránulos de TCP beta) es visible. En las vistas, prevalece la neogénesis ósea de DS64/01-03 y la proporción del material foráneo es menor. A mayor aumento, la vista DS64/04 muestra las primeras etapas de formación de hueso laminar (solo tras 12 semanas) y una aparición precoz de la formación de hueso laminar. Por lo general, el hueso laminar solo se puede detectar en ese tipo de muestras tras nueve meses más o menos. Las vistas DS64/05-07 muestran zonas aisladas de material foráneo, pero hay claros signos de neogénesis ósea vital en algunos lugares. Las vistas microscópicas DS64/08-10 se basan en la tinción con H y E a diferentes aumentos. Las vistas microscópicas muestran las primeras etapas del hueso laminar recién formado y, a mayores aumentos, cadenas de osteoblastos en la parte periférica. Las vistas D64/11-13 se han teñido con toluidina. Se puede encontrar una regeneración satisfactoria y material óseo recién formado dentro del núcleo de trépano.

25 En referencia a la Fig. 6, la visión de conjunto de la muestra DS78 enseña una menor neogénesis ósea dentro del núcleo de trépano. A mayores aumentos, hay indicios de hueso tejido; véanse las vistas microscópicas DS78/11-13. Por lo tanto, la maduración del hueso tejido en hueso laminar va a tener lugar.

En referencia a la Fig. 7, y con respecto a la muestra DS59, la visión de conjunto (DS59-9) del extremo izquierdo del núcleo de trépano muestra la reconstrucción ósea de largo alcance y la neogénesis ósea vital con solo algunos rastros de material foráneo. La visión de conjunto (DS59-06) del extremo derecho del núcleo de trépano también muestra una neogénesis ósea vital y la reconstrucción ósea. El material óseo recién formado es de tipo laminar, como se puede ver en la vista microscópica DS59/07. Esto significa una neogénesis muy activa. La vista DS59/09 muestra islotes de vasculogénesis y anginogénesis, por ejemplo, fibroblastos, osteoblastos, y también la formación de tejido conjuntivo y todos los signos de reconstrucción ósea y de neogénesis ósea.

En resumen, las muestras 64 y 59 muestran una temprana aparición y neogénesis ósea prepotente. La muestra 78 muestra una menor formación de hueso. En todos los casos, la histología reveló una formación potente de nuevo hueso tejido y laminar con solo rastros mínimos de material foráneo residual. Por lo tanto, el nuevo material biocompuesto de la invención parece haber experimentado una remodelación acelerada, y una reconstrucción y formación de hueso inducidas.

Ejemplo 6 - Actividad in vitro de rBSP humana en osteoclastos

45 La activación y diferenciación de los osteoclastos depende de la expresión de RANKL de los osteoblastos, así como de la expresión de OPG (osteoprotegerina). La OPG parece contrarrestar la actividad de RANKL e inhibir la diferenciación de los osteoclastos. Cuando se incubaron osteoblastos humanos primarios *in vitro* con rBSP humana y se determinó la expresión de OPG y RANKL en el sobrenadante mediante ELISA y PCR en tiempo real, se descubrió que la rBSP humana, en general, suprimió la expresión de RANKL de los osteoblastos y estimuló la liberación de OPG. Una mayor tasa de RANKL/OPG representa la activación de los osteoclastos, lo que puede explicar las propiedades osteoinductoras del material biocompuesto de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un material de injerto óseo para el tratamiento de defectos óseos y la neogénesis ósea, que es un material compuesto de un polímero biodegradable y gránulos de fosfato tricálcico beta, obtenido mediante las etapas de:

proporcionar una mezcla osteoinductora, que es una dispersión o solución a base de un compuesto orgánico que tiene al menos un grupo no reactivo básico que contiene nitrógeno, que tiene un valor de pKa de 2 a 14, compuesto orgánico que es tanto un agente dispersante como un plastificante del polímero o copolímero biodegradable y que puede formar una sal con una proteína que tiene una pKI de 4,0, y de una cantidad fisiológicamente eficaz de BSP humana recombinante activa obtenida en condiciones no desnaturalizantes, donde la BSP humana recombinante está presente en dicha mezcla osteoinductora en forma de sal o complejo que tiene afinidad reducida por el calcio, la hidroxiapatita y el factor H del complemento en comparación con la BSP humana normal presente en suero humano, y, opcionalmente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable;

proporcionar una mezcla osteoconductora a base de gránulos de difosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en forma de cristal beta, gránulos que están recubiertos con un polímero o copolímero biodegradable y, opcionalmente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, mezcla osteoconductora que es moldeable y conformable, y que se endurece rápidamente *in situ* cuando se coloca mediante cirugía u odontología protésica; y combinar dichas mezclas osteoinductora y osteoconductora para obtenerse un material de injerto óseo que fomente la reparación ósea y la curación de tejidos dañados y enfermos, y de lesiones.

2. El material de injerto óseo de la reivindicación 1, en el que la BSP humana osteoinductora es BSP humana infraglicosilada expresada y obtenida a partir de células eucariotas cultivadas en condiciones exentas de suero.

3. Un material de injerto óseo para el tratamiento de defectos óseos y la neogénesis ósea, que es un material compuesto de un polímero biodegradable y gránulos de fosfato tricálcico beta, obtenido mediante las etapas de proporcionar una mezcla osteoinductora, que es una dispersión o solución a base de un compuesto orgánico que tiene al menos un grupo no reactivo básico que contiene nitrógeno, que tiene un valor de pKa de 2 a 14, compuesto orgánico que es tanto un agente dispersante como un plastificante del polímero o copolímero biodegradable y que puede formar una sal con una proteína que tiene una pKI de 4,0, y de una cantidad fisiológicamente eficaz de BSP humana obtenida del calostro o de la leche materna en condiciones no desnaturalizantes, donde la BSP humana está presente en dicha mezcla osteoinductora en forma de sal o complejo que tiene afinidad reducida por el calcio, la hidroxiapatita y el factor H del complemento en comparación con la BSP normal presente en suero humano, y, opcionalmente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable; proporcionar una mezcla osteoconductora a base de gránulos de difosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en forma de cristal beta, gránulos que están recubiertos con un polímero o copolímero biodegradable y, opcionalmente, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, mezcla osteoconductora que es moldeable y conformable, y que se endurece rápidamente *in situ* cuando se coloca mediante cirugía u odontología protésica; y combinar dichas mezclas osteoinductora y osteoconductora para obtenerse un material de injerto óseo que fomente la reparación ósea y la curación de tejidos dañados y enfermos, y de lesiones.

4. El material de injerto óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto orgánico se selecciona del grupo que consiste en *N*-isopropilpirrolidona, *N*-metilpirimidina, *N*-etilpirimidina, *N*-metilpirrolidona (1-metil-2-pirrolidona), *N*-etilpirrolidona, *N*-propilpirrolidona, *N,N*-dietil-1,4-butanodiamina, 1-(2-aminoetil)-piperazina, 2-(1-pirrolidil)etilamina, 4-amino-2-metoxi-pirimidina, 2-dimetilaminoetanol, 1-(2-hidroxietyl)-piperazina, 4-(2-hidroxietyl)-morfolina, 2-mercaptopirimidina, 2-mercaptobencimidazol, *N,N*-dimetil-1,3-propanodiamina, 4-(2-aminoetil)-piridina, 2-amino-6-metoxibenzotiazol, 4-(aminoetyl)piridina, *N,N*-dialilmelamina, 3-amino-1,2,4-triazol, 1-(3-aminopropil)-imidazol, 4-(2-hidroxietyl)-piridina, 1-(2-hidroxietyl)-imidazol, 3-mercapto-1,2,4-triazol.

5. El material de injerto óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos polímeros o copolímeros biodegradables se seleccionan de grupo que consiste en poliglicólido, poli(L-láctido-co-glicólido), poli(D,L-láctido-co-glicólido), poli(L-láctido), poli(D,L-láctido), poli(L-láctido-co-D,L-láctido), policaprolactona, poli(L-láctido-co-caprolactona), poli(D,L-láctido-co-caprolactona), politrimetilencarbonatos, poli(L-láctido-co-trimetilencarbonato), poli(D,L-láctido-co-trimetilencarbonato), polidioxanonas, polímeros de ácido poliláctico, polímeros de ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y ácido poliglicólico, polihidroxi-butiratos, polidioxanonas de polihidroxi-valeratos, poliortoésteres, policarbonatos, politirosincarbonatos, polialquilenoxalatos de polioxicarbonatos, succinatos de polialquileno, poli(ácido málico), poli(anhídrido maleico), polipeptidos, polidepsipeptidos, poli(alcohol vinílico), poliesteramidas, poliamidas, polianhídridos, poliuretanos, polifosfacenos, policianoacrilatos, polifumaratos, poli(aminoácidos), polisacáridos modificados, proteínas modificadas y sus copolímeros, terpolímeros o combinaciones o mezclas, o mezclas de polímeros de los mismos.

6. El material de injerto óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha mezcla osteoconductora comprende gránulos recubiertos de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) que tiene diámetros de 300 a 800 μm para su uso en odontología protésica.

7. El material de injerto óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho material compuesto

comprende más del 50 por ciento en volumen de gránulos de fosfato tricálcico beta, entre el 10 y 40 por ciento en volumen de una base polimérica que incluye uno o más polímeros y copolímeros biodegradables, del 0,5 al 10 por ciento en volumen de una primera mezcla osteoinductora que aumenta la plasticidad y la trabajabilidad del material biocompuesto, y como disolvente o agente de dispersión de la BSP.

5 8. El material de injerto óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho material compuesto comprende BSP humana en una cantidad de 10 a 200 ng/ml (p/v) de material compuesto.

10 9. El material de injerto óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha mezcla osteoconductora comprende BSP humana en una cantidad de 10 a 200 µg/ml (p/v) antes del endurecimiento.

15 10. El material de injerto óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho polímero biodegradable es un copolímero de ácido poliláctico y ácido poliglicólico, cuya composición es del 50 al 80 por ciento de ácido láctico y del 20 al 50 por ciento de ácido glicólico, y un copolímero de PLA:PGA que tiene un intervalo de peso molecular medio en peso de entre 25.000 y 1.000.000.

11. El material de injerto óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que tiene un módulo de Young de entre 1 GPa y 10 Gpa tras el endurecimiento.

20 12. Un método de fabricación de un material de injerto óseo que tiene propiedades osteoinductoras y osteoconductoras que comprende las etapas de:

25 proporcionar una mezcla osteoinductora, que es una dispersión o solución a base de un compuesto orgánico que tiene al menos un grupo no reactivo básico que contiene nitrógeno, que tiene un valor de pKa de 2 a 14, compuesto orgánico que es tanto un agente dispersante como un plastificante del polímero o copolímero biodegradable y que puede formar una sal con una proteína que tiene una pK_I de 4,0, y de una cantidad fisiológicamente eficaz de BSP humana recombinante activa; proporcionar una mezcla osteoconductora a base de gránulos de difosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂) en forma de cristal beta, gránulos que están recubiertos con un polímero o copolímero biodegradable; y combinar dichas mezclas osteoinductora y osteoconductora para obtenerse un material compuesto que, inicialmente, es moldeable y conformable, y que se endurece *in situ* cuando se coloca por cirugía u odontología protésica.

30

Fig 1

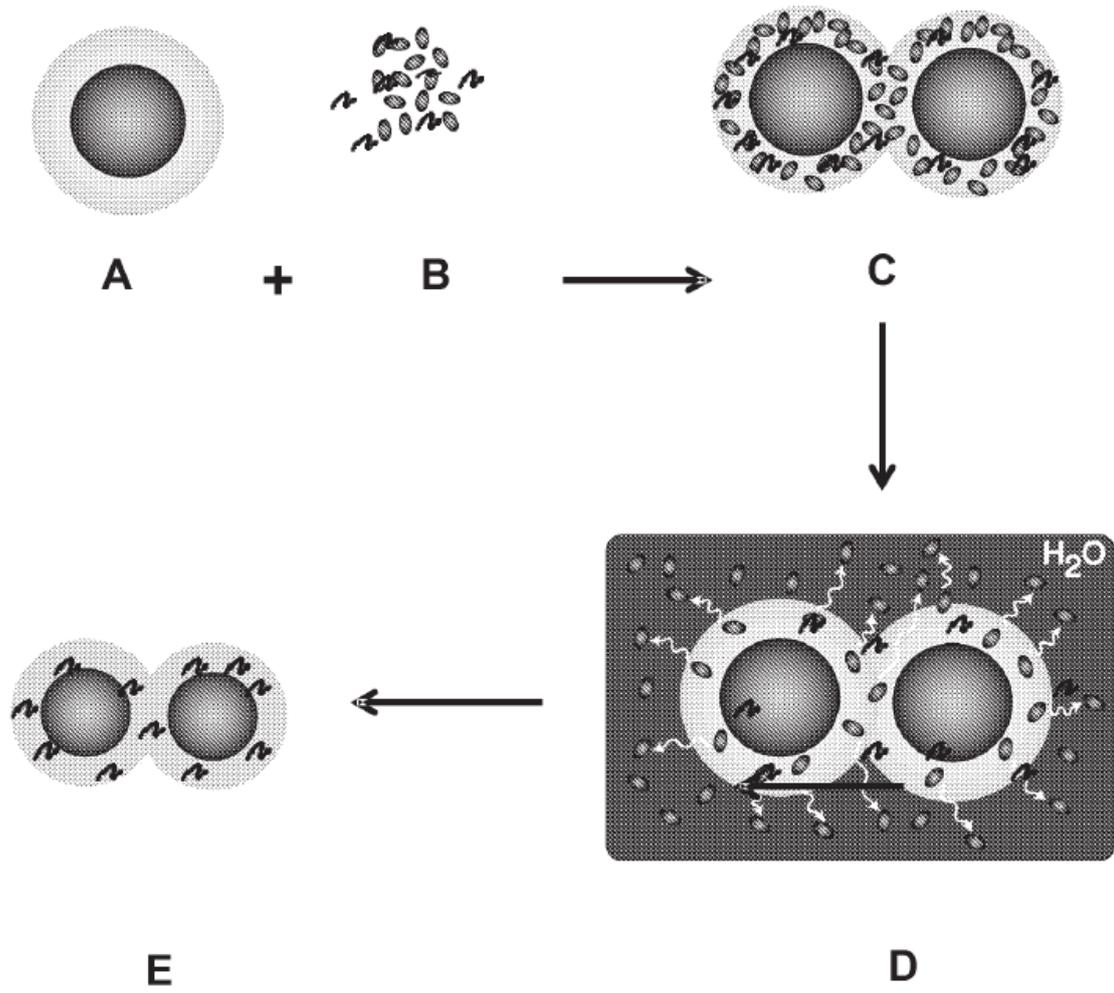


Fig 2A

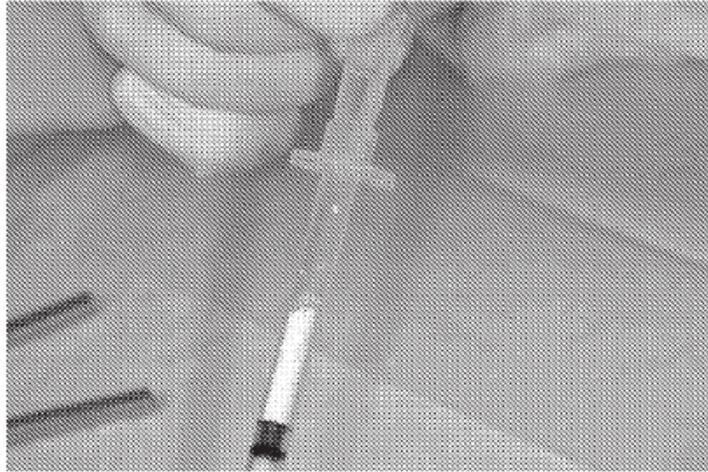


Fig 2B

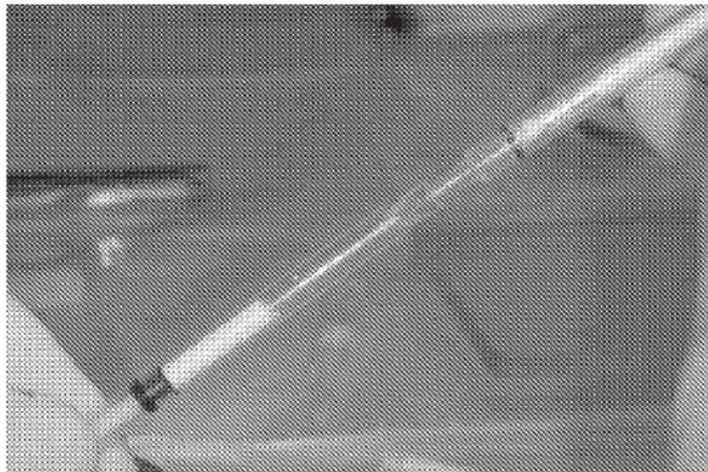


Fig 2C

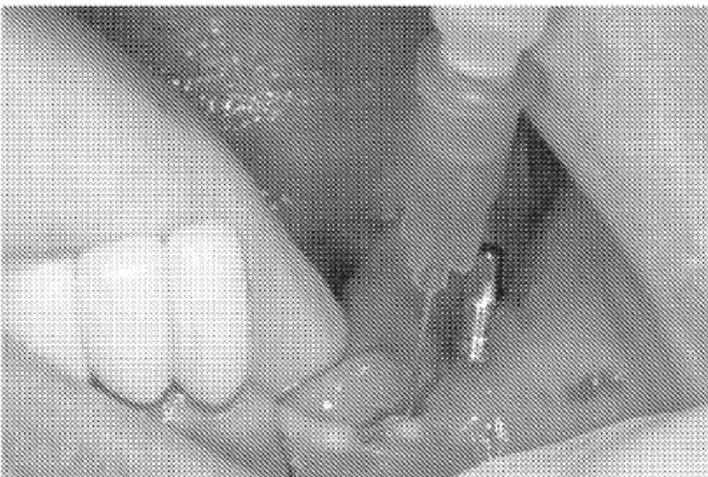


Fig 3A

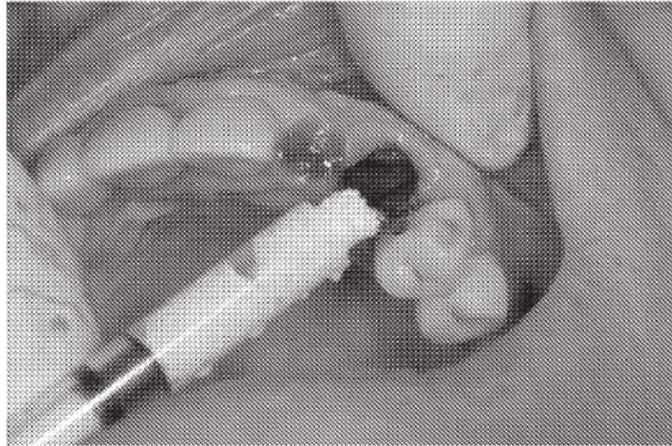


Fig 3B

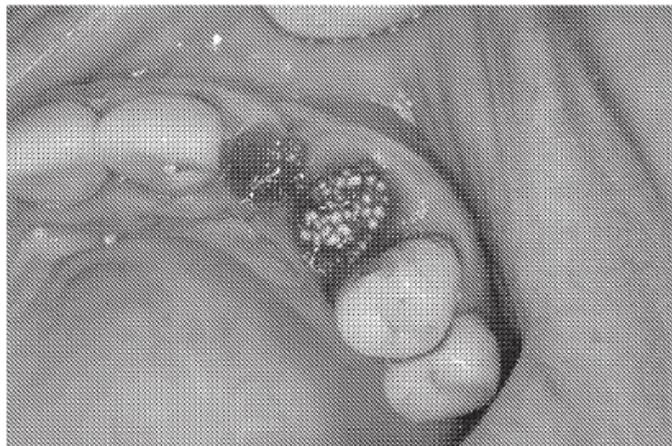


Fig 3C



Fig 4A

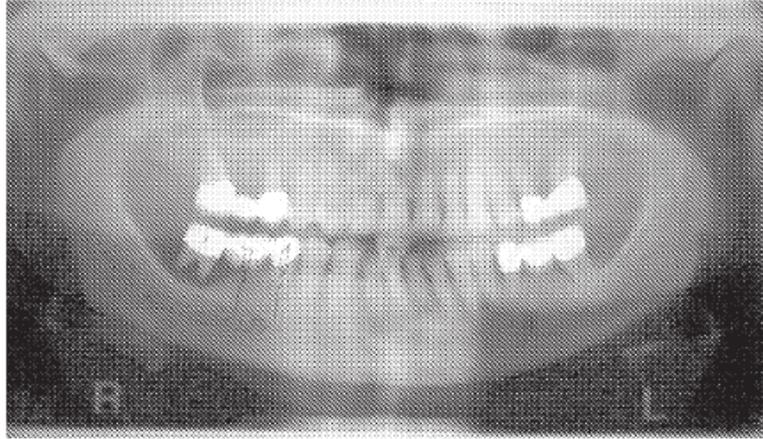


Fig 4B

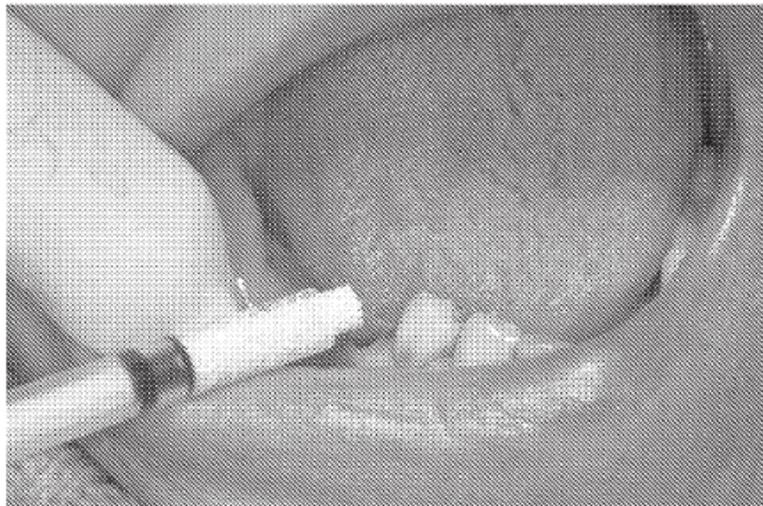


Fig 4C



Fig 4D



Fig 4E

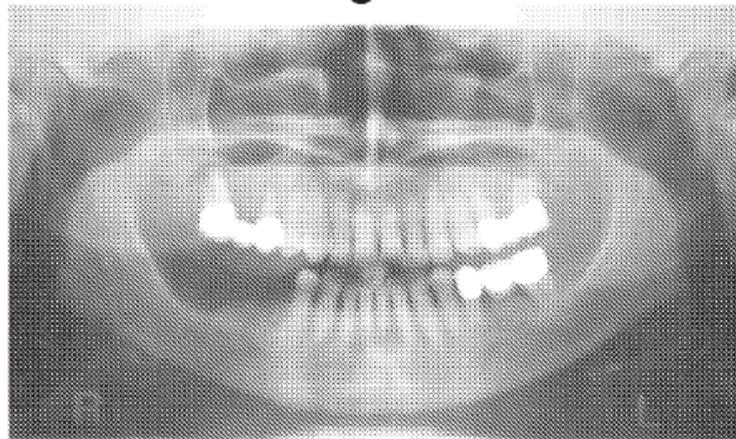


Fig 4F

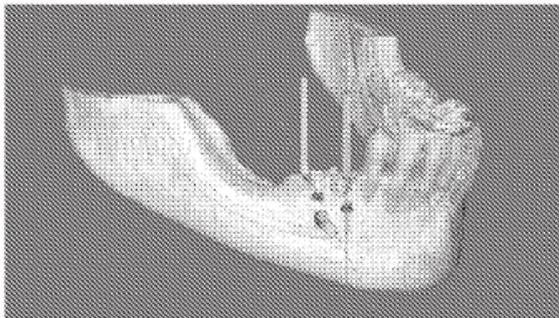


Fig 4G

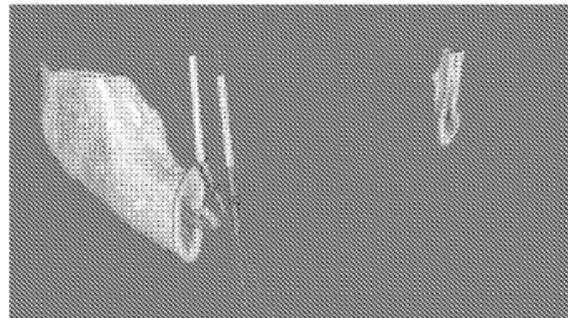


Fig. 4H



Fig. 4J

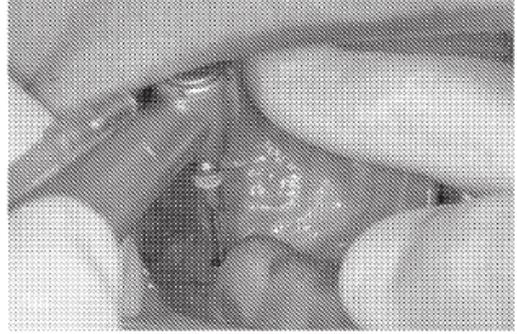


Fig. 4K



Fig. 4L

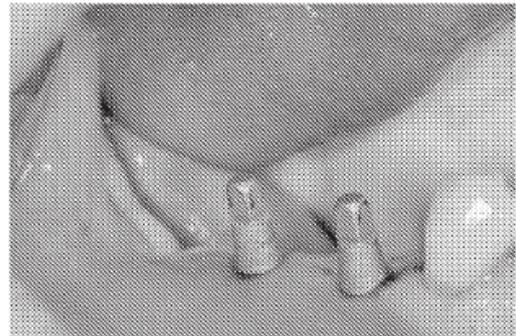


Fig. 4M

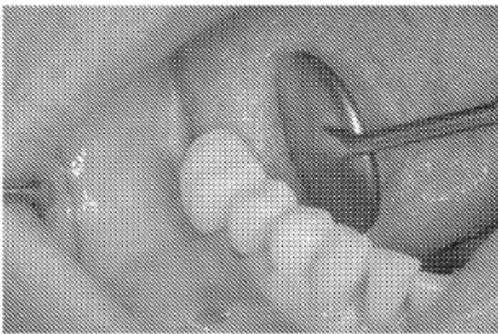


Fig. 4N

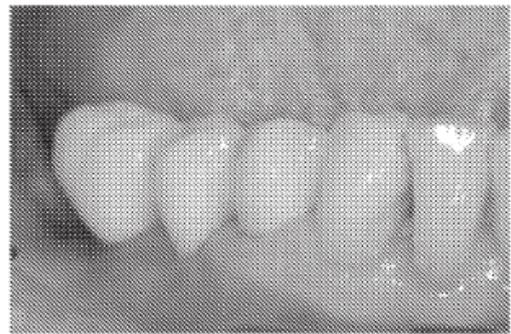
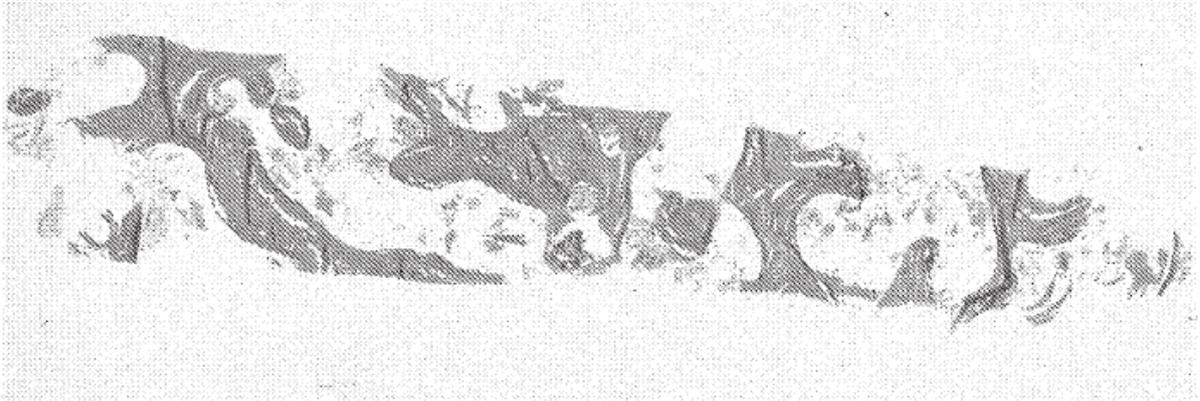
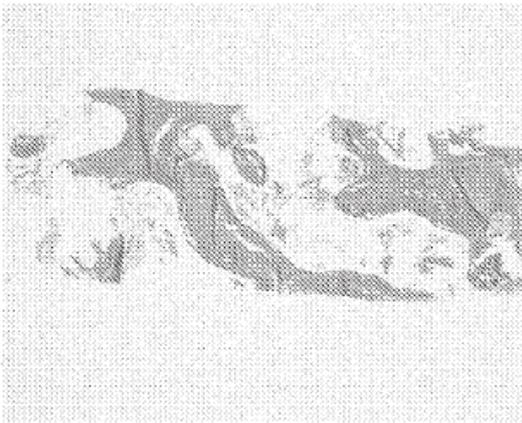


Fig. 5

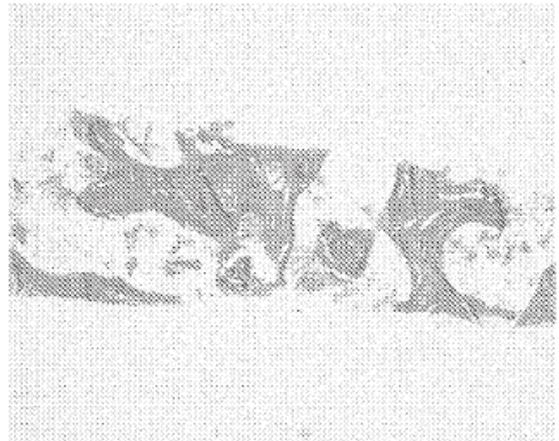
DS64



DS64-1



DS64-2



DS64-3



DS64-4



Fig 5 (Continuación)

DS64-5



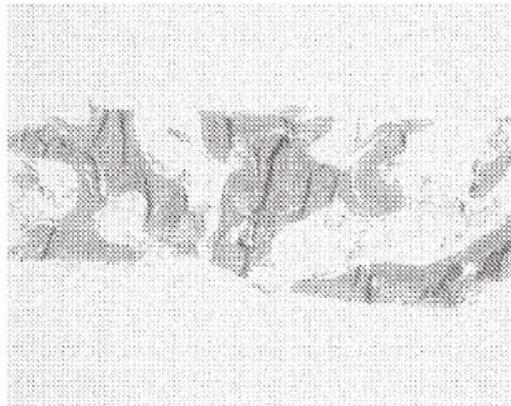
DS64-6



DS64-7



DS64-8



DS64-9



DS64-10

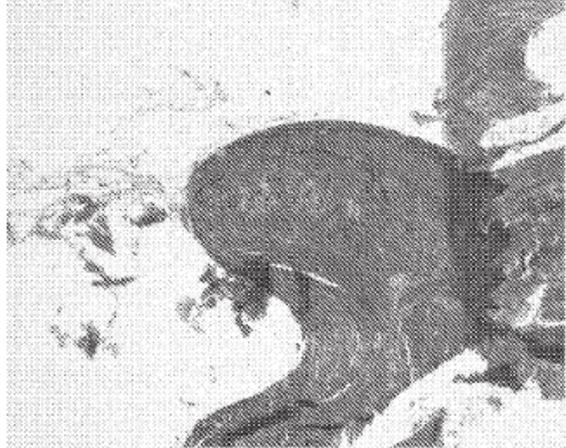


Fig 5 (Continuación)

DS64-11



DS64-12



DS64-13

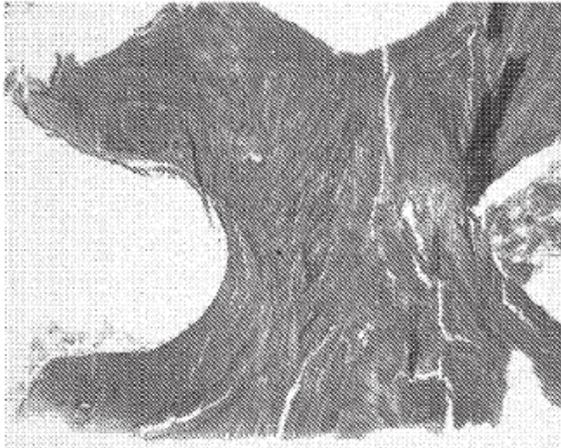


Fig 6

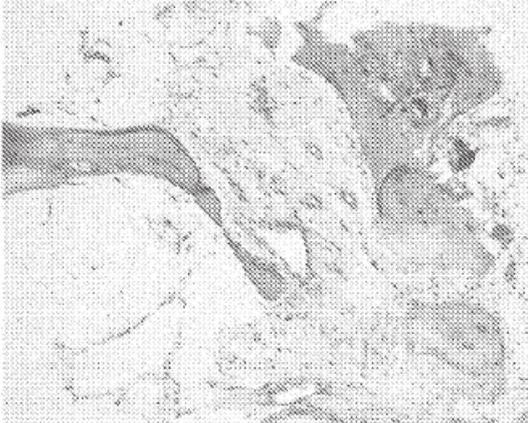
DS78-01



DS78-02



DS78-03



DS78-04



DS78-05



DS78-06

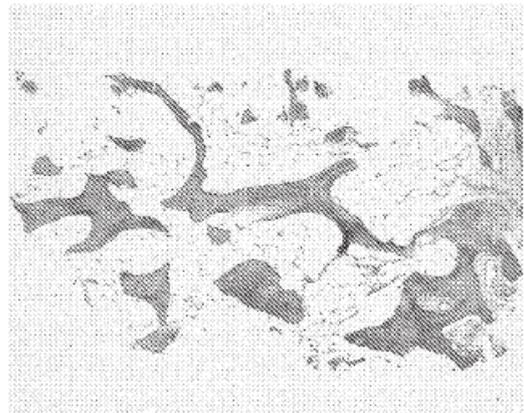
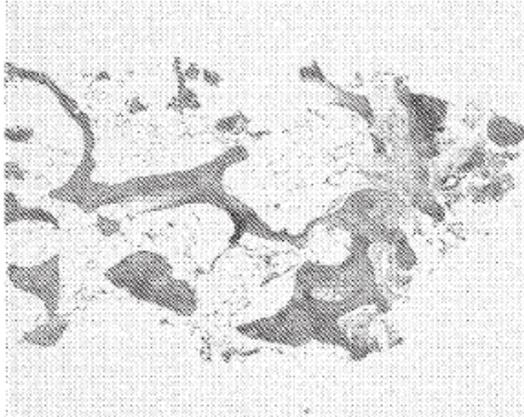
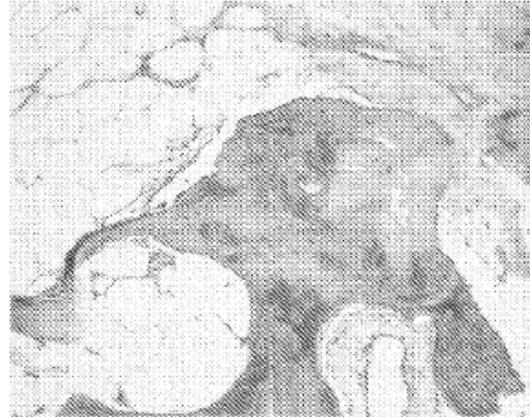


Fig 6 (Continuación)

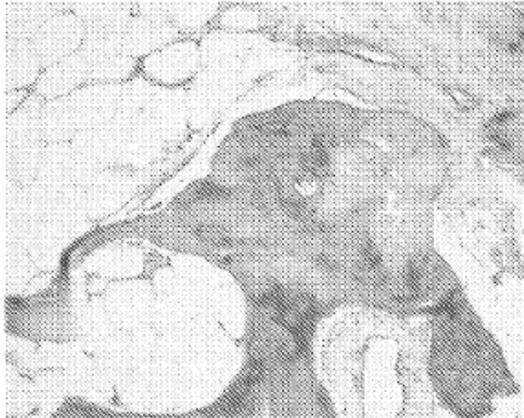
DS78-07



DS78-08



DS78-09



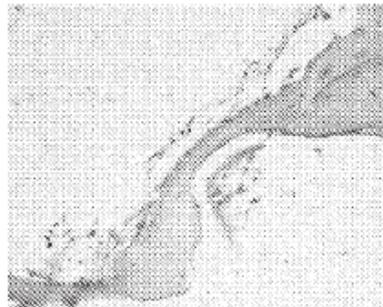
DS78-10



DS78-11



DS78-12

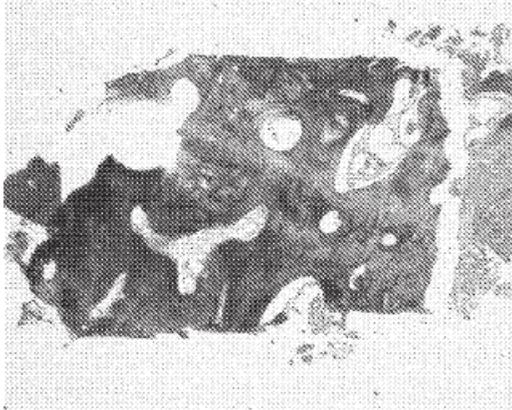


DS78-13

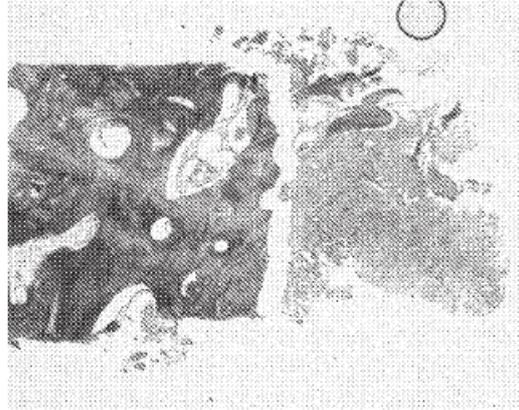


Fig. 7

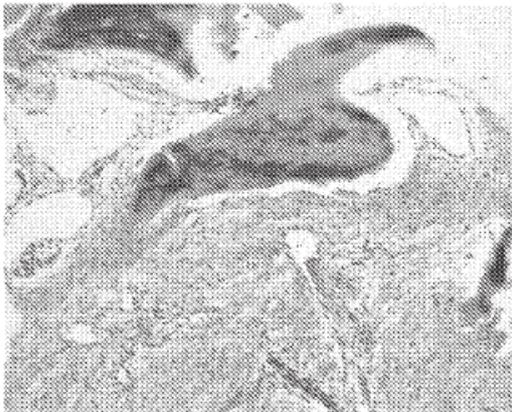
DS59-01



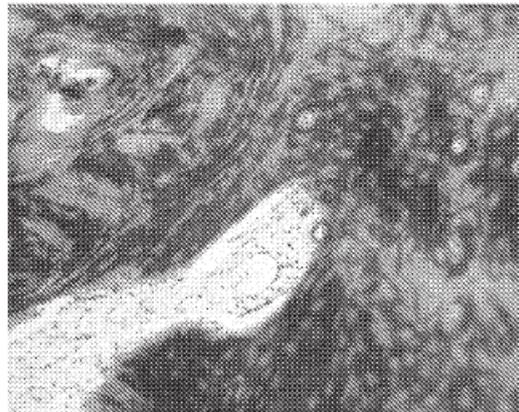
DS59-02



DS59-03



DS59-04



DS59-05

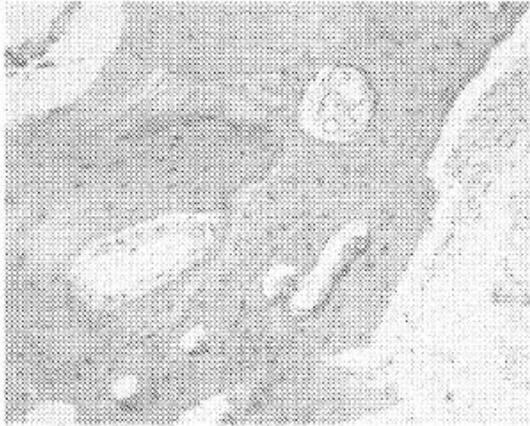


DS59-06



Fig. 7 (Continuación)

DS59-07



DS59-08



DS59-09

