

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 070**

51 Int. Cl.:

C01B 25/32 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2009 PCT/ES2009/000358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2010 WO10004066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2009 E 09793974 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2298696**

54 Título: **Matrices tridimensionales de monetita porosa estructurada para ingeniería tisular y regeneración ósea, y método de preparación de las mismas**

30 Prioridad:

08.07.2008 WO PCT/ES2008/000482

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

16.07.2018

73 Titular/es:

**HISTOCELL, S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico 800, 2º
48160 Derio (Bizkaia), ES**

72 Inventor/es:

**FONT PÉREZ, JULIO;
CASTRO FEO, MARÍA BEGOÑA;
DEL OLMO BASTERRECHEA, MAITE;
GARCÍA VÁZQUEZ, MARÍA DOLORES;
RUBIO RETAMA, JORGE;
LÓPEZ CABARCOS, ENRIQUE;
RUEDA RODRÍGUEZ, CARMEN;
TAMIMI MARIÑO, FALEH y
HAMDAN ALI ALKHRAISAT, MOHAMMAD**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 676 070 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).

Matrices tridimensionales de monetita porosa estructurada para ingeniería tisular y regeneración ósea, y método de preparación de las mismas

DESCRIPCIÓN

5 Campo de la invención

La presente invención se enmarca dentro de la ingeniería tisular y, en concreto dentro de la regeneración ósea. La invención se refiere a una matriz tridimensional porosa de monetita biocompatible, de porosidad estructurada, predefinida y reabsorbible, así como al método de síntesis capaz de producir dicho material y a sus aplicaciones. Estas matrices constituyen una base perfecta para la colonización y proliferación celular permitiendo su aplicación en ingeniería tisular y regeneración ósea gracias a sus ventajosas propiedades de biocompatibilidad, reabsorción, osteoinducción, revascularización, etc.

15 Antecedentes de la invención

La pérdida de masa y calidad ósea es un grave problema de salud que resulta aún más frecuente en pacientes de edad avanzada.

El éxito en la regeneración de un defecto óseo utilizando materiales tridimensionales, que inicialmente son colonizados por células progenitoras *in vitro*, depende en gran medida de las características y estructura del material.

Desde hace casi un siglo se utilizan biomateriales para reparar o reemplazar segmentos óseos del sistema musculoesquelético.

El uso de injertos de hueso autógeno, es decir del propio individuo, es un método muy utilizado para rellenar cavidades óseas y para reconstrucciones quirúrgicas. Sin embargo, existe un suministro limitado de hueso y además se somete al paciente a un trauma adicional para obtener el injerto. Otra opción la constituyen los aloinjertos de donantes, que también presentan inconvenientes, como una velocidad de neoformación ósea más lenta, inferior capacidad osteogénica, velocidad de reabsorción, menor revascularización así como un mayor riesgo de respuesta inmunogénica y transmisión de agentes patógenos.

Lo ideal es obtener un material similar al hueso, que sea biocompatible, no presente reacciones biológicas adversas, sea reabsorbible y se degrade de forma paulatina a medida que se forma el nuevo tejido, transfiriendo así las cargas de forma progresiva al nuevo hueso, evitando una segunda intervención quirúrgica para la extracción del implante. Lo ideal también es un material cuyos productos de degradación sean de fácil eliminación y no tóxicos, que sea osteoinductivo e induzca la formación de tejido óseo.

En el organismo, la degradación y reabsorción del hueso la llevan a cabo los osteoclastos. Estas son unas células derivadas de los monocitos que se fijan a la superficie del hueso. Una vez fijadas, empiezan a liberar protones al exterior, con el fin de reducir el pH del medio externo. Con este ambiente ácido se consiguen solubilizar los cristales de hidroxapatita que forman parte del componente mineral del hueso. La hidroxapatita del hueso se solubiliza en partículas amorfas de fosfato de calcio, que son eliminadas por los macrófagos, o en iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} que se acumulan en el líquido extracelular. Estos iones se esparcen hacia los capilares sanguíneos entrando en la circulación sistémica para ser eliminados por la orina a través del riñón. Estos iones liberados también pueden ser reutilizados por los osteoblastos para formar hueso nuevo. Los osteoclastos son los encargados también de la degradación de la fase orgánica del hueso mediante procesos enzimáticos.

La investigación en nuevos biomateriales para reparación ósea trata de reducir al máximo la necesidad del injerto óseo, buscando un sustituto artificial que con el tiempo se reabsorba y/o integre al hueso adyacente y, además, sirva de fijación en fracturas osteoporóticas. Las propiedades mecánicas del sustituto óseo deben ser lo más parecidas posibles a las del hueso esponjoso. El material debe además ayudar a la estabilidad de la fractura y ser suficientemente resistente para disminuir el tiempo necesario de inmovilización o soporte externo. Dicho material debe ser reabsorbible, biocompatible y osteoinductivo, es decir debe atraer células mesenquimatosas y otros tipos celulares situados cerca del implante y favorecer su diferenciación en osteoblastos, y también osteoconductor, es decir debe actuar como molde para la formación de nuevo hueso.

Buscando una similitud con lo que sucede en el organismo, se están sustituyendo los materiales no reabsorbibles utilizados hasta ahora en los implantes óseos por los reabsorbibles. Estos biomateriales no interfieren en el desarrollo y crecimiento del hueso nuevo formado, ya que son reemplazados de forma gradual por tejido del hospedador. Además, presentan una mayor biocompatibilidad, participan de una manera natural en la reconstrucción ósea y no se necesita eliminarlos, mediante cirugía, tras la regeneración del hueso. Estos materiales tienen que mantenerse el tiempo suficiente para que se de la correcta regeneración del hueso y desintegrarse gradualmente sin producir daños al paciente y sin intervenir en el correcto desarrollo y crecimiento del hueso.

Los biomateriales que fraguan formando un fosfato cálcico mineral tienen especial interés en la regeneración ósea ya que se asemejan a la fase mineral del hueso natural y son susceptibles de remodelado óseo y de reabsorción debido a su estructura cristalina metaestable.

5 Entre los materiales reabsorbibles que se están empleando como sustitutos óseos destacan los fosfatos de calcio; hidroxiapatita (HAP), fosfato tricalcico (B-TCP) y el fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) (Stubbs *et al.*, 2004; Schnettler *et al.*, 2004). Estos materiales poseen una excelente biocompatibilidad por su parecido químico y cristalino con el componente mineral del hueso, pero presentan diferencias en cuanto a la solubilidad y capacidad de reabsorción *in vivo*.

10 La hidroxiapatita (HAP) ha sido uno de los que más interés ha generado. Este material, es *per se* la fase inorgánica de la que están formados los huesos y es por ello por lo que ha sido ampliamente utilizado en regeneración ósea. Ejemplo de ello son algunos productos comerciales como Interpore 200® Interpore 500®, Cerasorb® y Collagraft®. Sin embargo, y debido a que presenta una de las estructuras cristalinas más estables, el material adolece de una lenta reabsorción.

15 La HAP es el material que presenta mayor biocompatibilidad, por ser el más parecido a los cristales formados por el hueso, pero no es reabsorbible *in vivo*. La degradación de este material se produce por contacto con soluciones con un pH bajo y por fagocitosis. Mediante la disolución se liberan partículas de fosfato cálcico amorfo que pueden ser eliminados por los macrófagos por fagocitosis o quedar embebidos en el nuevo hueso formado. Los macrófagos pueden disolver estas partículas y restaurar el Ca y P al pool del organismo (Frayssinet *et al.*, 1999; Benahmed *et al.*, 1996). Sin embargo, no se ha observado que estas partículas den lugar a activación osteoclástica (Frayssinet *et al.*, 1999).

20 Todos los estudios realizados corroboran la resistencia de este material a la degradación una vez está implantado en el organismo, debido a su escasa solubilidad a pH fisiológicos. Implantes de este tipo en animales, se reabsorben un 5,4 % en 6 meses frente a diferencia de los basados en B-TCP, que lo hacen en un 85 %. (Eggli *et al.*, 1988).

25 En humanos, los implantes realizados con Bio-Oss (HAP) se consideran como no reabsorbibles, ya que los estudios llevados a cabo demuestran que se necesita entre 3-6 años para que se reabsorban debido a la actividad osteoclastica (Taylor *et al.*, 2002). La presencia de este material en el organismo durante tanto tiempo puede interferir en el proceso de remodelado óseo, así como en la capacidad de osteointegración (Affe *et al.*, 2005; De Boever 2005).

30 A causa de esto, este material ha sido tradicionalmente empleado en mezclas con material orgánico como polímeros para aumentar su reabsorción. Ejemplos de estas aplicaciones están descritos en US5866155, donde se describe la incorporación de hidroxiapatita en matrices de poliláctico o en US-A5741329 que es una variación de US5866155 donde se pretende corregir algunos defectos derivados de la acidificación local del medio tras la incorporación de los cementos en el organismo.

35 Por ello, con el fin de mejorar la capacidad de reabsorción de los fosfatos cálcicos e incrementar su capacidad osteoconductor, en los últimos años se han utilizado fases cristalinas de fosfato cálcico menos estables que la hidroxiapatita 6. como el B-TCP y DCPD (brushita) que presentan mejor solubilidad y reabsorción *in vivo*.

40 El B-TCP presenta más osteoconductividad y una mejor reabsorción que la HAP (Franco *et al.*, 2006). Se considera como un material moderadamente reabsorbible, en estudios *in vivo* se ha observado que se necesita al menos un año para su reabsorción en animales y de 6 a 8 meses en humanos (Wiltfang *et al.*, 2003; Suba *et al.*, 2004). Su degradación aumenta los depósitos de calcio y esto está asociado a una mayor actividad fosfatasa alcalina, enzima que interviene en la formación de hueso (Trisi *et al.*, 2003; Sugawara *et al.*, 2004).

45 El DCPD es también biocompatible, osteoconductor y el más reabsorbible por ser el más soluble a pH fisiológicos. Esto permite que se forme hueso nuevo de forma más rápida. Se biodegrada en ambientes fisiológicos y es reabsorbido por las células adyacentes (Tris *et al.* 2003). Esta comprobado que se reabsorbe *in vivo*, hasta tres veces más rápido que la HAP y el B-TCP (Herron *et al.*, 2003; Chow *et al.*, 2003; Tas & Bhaduri 2004; Tamini *et al.*, 2006;).

50 Algunos estudios sugieren que parte del material DPDC puede convertirse en HAP despues de su implante, esto puede retrasar varias semanas la eliminación del implante por parte de los osteoclastos (Constanz *et al.*, 1998). Esta conversión puede hacer que las células acidifiquen el medio y disminuya la biocompatibilidad del material junto con una reducción en su reabsorción. La adición de sales de Mg y de Ca (carbonato cálcico) o su combinación con B-TCP pueden evitar esta conversión.

Usando este material se observa de manera equilibrada se produce la generación de hueso y la eliminación del

material a partir de la 4ª semana (Fallet *et al.*, 2006) y la 8ª semana postintervención (Constanz *et al.*, 1998). Esto es importante ya que si la degradación fuera mayor que la síntesis se produciría inestabilidad y reacciones inflamatorias.

Así, entre estos fosfatos cálcicos, la brushita (DPCD) es uno de los materiales de mayor interés en la regeneración ósea. Debido a sus interesantes propiedades existen en la actualidad cementos de brushita diseñados para el fraguado *in situ*. Así por ejemplo en las patentes US6733582 y US2006213398 son reivindicados cementos de brushita de fraguado *in situ* siendo Chronoss Inject® un producto de este tipo ya comercializado. Sin embargo este material tiene un gran problema a la hora de ser esterilizado ya que se descompone cuando se calienta lo que dificulta su apropiada esterilización.

El estado de la técnica contempla diferentes publicaciones relativas a la esterilización de cementos que pueden ser empleados como sucedáneos de material óseo, así como sobre los métodos empleados para realizar dichas matrices y su esterilización. Sin embargo, tal y como refleja la solicitud de patente JP2004018459, cuando dichos cementos son esterilizados por autoclave, las características de dichos cementos se ven alteradas traduciéndose en la obtención de sucedáneos de mineral óseo que no reúnen las características necesarias para su empleo en regeneración ósea en cuanto a reabsorción, estabilidad y colonización y demás propiedades esenciales.

Como sucede con el DPCD, la monetita se reabsorbe *in vivo* en tiempo y modo similar. Se disuelve a pH fisiológicos, de manera gradual en los tejidos extracelulares que envuelven el implante y las propias células que lo colonizan, (células endoteliales, osteoclastos, osteoblastos, macrófagos...) serían los responsables de su eliminación o reutilización como sucede en el hueso. Los documentos como US20060263443 presentan monetita, fosfato dicálcico anhidro (DCPA), obtenido por deshidratación de brushita, en combinación con otros biomateriales de fosfato cálcico. Debido a la combinación, los resultados de esterilización no han sido aceptables para la utilización de estos materiales en implantes y regeneración ósea. Adicionalmente, estos materiales constituyen intermediarios de reacción y no estructuras con capacidad propia para ser empleadas en el campo técnico de la regeneración ósea.

Adicionalmente, para una correcta regeneración ósea, es necesario que el biomaterial presente una porosidad adecuada que permita la colonización y proliferación celular, vascularización, aumento de la superficie de contacto y por tanto aumento de la superficie de interacción con el tejido hospedador que permita la aceleración de la regeneración ósea. Estas características deben ir acompañadas de una correcta tasa de reabsorción que proporcione a las células el tiempo necesario para la regeneración.

Así, Gbureck, Uwe *et al.*, 2007, se refieren a implantes de brushita y monetita preparados mediante la técnica de impresión tridimensional. Para conseguir dichos implantes, en primer lugar se obtienen matrices de brushita que son deshidratadas hidrotérmicamente transformándose en monetita. Sin embargo, en la tabla 2 de dicho artículo se muestra que el material de fosfato de calcio definido como monetita en dicho artículo, únicamente presenta un contenido del 63 % en monetita, no especificando ni el tamaño ni la distribución de su porosidad, presentado una porosidad desestructurada. Así, dichas estructuras no son válidas a los efectos de la presente invención.

El documento US6905516 presenta sustitutos de hueso con forma anatómica controlada que se ajustan de forma exacta a la morfología de la lesión. Dichos sustitutos están compuestos por materiales de cementos de fosfato cálcico químicamente consolidados. La invención también se refiere a moldes y fases porogénicas que permitan obtener fosfatos cálcicos con geometrías externas y arquitecturas macroporosas mediante el uso de dichos moldes. Sin embargo, en sus realizaciones particulares, la invención presenta materiales de brushita, no presentando materiales de monetita y no siendo tampoco las estructuras macroporosas en él presentadas válidas al objeto de la presente invención. Así, la presente invención proporciona matrices de monetita (fase metaestable de fosfato cálcico de monetita), con una elevada estabilidad térmica que permite la esterilización del material mediante autoclavado, simplificando así los procesos de esterilización y que además, por su disposición específica estructural de poros, disposición que se obtienen gracias a un diseño específico del material, supone una mejora de la capacidad osteoinductiva de materiales propuestos por el estado de la técnica ya que es sintetizada en forma de bloque poroso con unas características de macroporosidad estructurada definidas incrementando la superficie específica, así como la zona de contacto con los osteoblastos y facilitando los procesos de transporte de nutrientes para las células, factor crucial para la osteogénesis. Todo ello junto con su elevada capacidad de reabsorción en el periodo de tiempo adecuado para que las células adyacentes colonicen el material y puedan reemplazar el material reabsorbido por matriz ósea fisiológica.

La degradación *in vitro* de las matrices de la invención no afecta a la proliferación celular y además son bioactivas, no citotóxicas, no mutagénicas y hemocompatibles.

60 Descripción de la invención

Para que un biomaterial pueda dar lugar a una regeneración ósea estable, las células de la zona del implante, osteoblastos del hueso adyacente, células madre mesenquimatosas de la médula ósea y células endoteliales de la circulación sistémica, deben ser capaces de colonizar de forma simultánea y homogénea el biomaterial. Esto

permitirá la formación de una nueva matriz ósea fisiológica a medida que se va reabsorbiendo el biomaterial y el desarrollo de un nuevo sistema vascular, que será el que suministre el aporte sanguíneo necesario para la supervivencia del nuevo tejido.

5 Una propiedad importante a tener en cuenta en relación a este aspecto es la estructura porosa, porque influye tanto en la biodegradabilidad, a mayor grado de porosidad mejor es la reabsorción, como en la colonización celular. Los materiales deben poseer tamaños de poros e interconexiones que permitan la colonización tanto de células endoteliales (para la formación de nuevos vasos sanguíneos) como de las células óseas. Además, el carácter microporoso e interconectado, que permite la difusión de nutrientes y gases y también de los metabolitos propios de la actividad celular. El hueso no es un material compacto sino que posee porosidades diferentes que se intercomunican. Sistemas de poros interconectados comunican el hueso macizo (cortical) con el esponjoso (trabecular) (Figura 16). Estas porosidades van desde los 100-150 μm en el hueso cortical a 500-600 μm en el esponjoso.

15 La presente invención presenta un nuevo sistema de ingeniería tisular, destinado a regenerar la estructura ósea abordando una estrategia curativa en vez de meramente reparadora. Dicha regeneración tiene aplicación frente a la osteoporosis.

20 La ingeniería tisular se plantea como una disciplina que mejora, mantiene y repara patologías en órganos y en tejidos. La creación de un sistema basado en la ingeniería tisular implica la integración de células viables, un material biocompatible diseñado especialmente para una aplicación biomédica y moléculas de señalización que regulan las actividades celulares que se requieren en cada momento del tratamiento.

25 Así, la presente invención proporciona matrices con geometría de porosidad no aleatoria, es decir, ordenada o predefinida, compuestas de monetita, en cuyo diseño se han tenido en cuenta las porosidades del hueso, para que se de la neovascularización y la colonización celular. Dicho material se presenta esterilizado, listo para su uso y gracias a su diseño específico, consigue una disposición específica estructural de poros, es decir, una distribución espacial y configuración espacial de porosidad ordenada inducida y previamente establecida, que supone una mejora de la capacidad osteoinductiva frente a otros fosfatos de calcio, incluidos otras combinaciones de fosfato de calcio que incluyan monetita.

35 Dichas matrices son obtenidas en forma de bloque poroso con unas características de macro, meso y microporosidad definidas que incrementan la superficie específica, así como la zona de contacto con los osteoblastos, facilitando los procesos de transporte de nutrientes para las células, factor crucial para la osteogeneración.

El diseño de estas matrices de monetita de la invención ha tenido en cuenta las porosidades características del hueso natural, porosidades que permiten la neovascularización y la colonización celular.

40 Las nuevas matrices de la invención están compuestas por el biomaterial monetita, un DPCD deshidratado (DPC), ideal para la regeneración ósea. Dichas matrices están constituidas al menos por un 95 % \pm 5 % de monetita, preferiblemente por un 95 % de monetita y más preferiblemente por un 100 % de monetita. Las trazas de material corresponden a fosfato tetracálcico beta. La degradación *in vitro* de este material no afecta a la proliferación celular y además es bioactivo, no citotóxico, no mutagénico y hemocompatible como se demuestra en el ejemplo 4.

45 Gracias a su diseño y composición, las matrices de la invención se reabsorben en el periodo de tiempo adecuado para que las células adyacentes colonicen el material y puedan reemplazar el material reabsorbido por matriz ósea fisiológica.

50 "Matriz" se refiere a cualquier estructura tridimensional de utilidad en regeneración ósea que permita el crecimiento y proliferación celular de las células que la invadan.

Como "células" se entiende:

55 - células madre mesenquimales adultas obtenidas preferentemente del tejido adiposo, pero también pueden ser de médula ósea o cualquier otra localización que se haya demostrado que puede ser fuente de estas células. Estas células pueden utilizarse diferenciadas hacia la estirpe osteoblástica o endotelial.

- Osteoblastos obtenidos de fragmentos de hueso.

60 - Células endoteliales.

- Combinaciones de células madre mesenquimatosas adultas no diferenciadas o diferenciadas hacia la estirpe osteoblástica o endotelial, osteoblastos, osteoclastos, osteocitos de hueso y células endoteliales.

Macroporos: cuando los poros presentan diámetros mayores o iguales a 100 micras.

Mesoporos: cuando los poros presentan diámetros menores de 100 micras pero mayores o iguales a 10 micras.

5

Microporos: Cuando los poros presentan un diámetro menor de 10 micras.

Matriz amorfa: Aquella que, presenta una geometría de porosidad aleatoria, no ordenada ni predefinida, que no sigue una distribución espacial y configuración espacial de porosidad ordenada y previamente establecida, independientemente de que dicha porosidad sea natural (intrínseca al material) o inducida.

10

Matriz estructurada o de porosidad estructurada: Aquella que presenta una geometría de porosidad no aleatoria, ordenada o predefinida, presentando una distribución espacial y configuración espacial de porosidad ordenada inducida y previamente establecida. Las matrices de la presente invención son matrices de porosidad estructurada con una porosidad predefinida que les confiere una serie de propiedades ideales para su uso en regeneración ósea.

15

Osteoinducción: neoformación ósea por aposición hasta el material, formando un armazón para la proliferación celular con actividad osteoblástica, formando hueso nuevo. Es el acto o proceso de estimular la osteogénesis.

20

Osteogénesis: generación o desarrollo de tejido óseo, a través de la diferenciación de las células mesenquimáticas hacia osteoblastos.

Regeneración ósea: formación de hueso nuevo que, tras un proceso de remodelado, sea idéntico al preexistente. En la regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. El biomaterial de la invención encuentra aplicación en la ingeniería tisular y regeneración ósea y, por tanto, puede emplearse en el tratamiento de las siguientes patologías óseas:

25

- Pseudoartrosis hipertrófica y no hipertrófica
- Osteonecrosis
- Osteoporosis
- Defectos óseos producidos tras la retirada de una prótesis, extirpación de un tumor, por desórdenes bioquímicos y metabólicos o enfermedades congénitas
- Tratamiento de lesiones y traumatismos
- Tratamiento de fracturas óseas
- Cualquier patología en la que sea necesaria la reparación del tejido óseo
- Tratamiento de defectos óseos maxilofaciales
- Aumento óseo previa a la aplicación de implantes dentales

30

35

40

Colonización celular: capacidad de expansión de las células sobre el biomaterial, siendo capaces de proliferar y aumentar la población celular hasta invadir toda la matriz. Una medida de la capacidad de colonización de una matriz es el análisis del número de células sobre el biomaterial a lo largo del tiempo (datos de la gráfica de proliferación).

45

Adhesión celular: capacidad que presentan las células de unirse a otras células o a una matriz. La adhesión se puede producir por interacciones específicas como las fuerzas electrostáticas y está regulada por proteínas específicas denominadas moléculas de adhesión. La capacidad de adhesión a un biomaterial puede analizarse mediante la visualización al microscopio de las células dispuesta sobre el biomaterial. La superficie de contacto entre las células y biomaterial, será una medida representativa de la afinidad que presenten las células por ese biomaterial.

50

En un primer aspecto, la presente invención hace referencia a matrices tridimensionales biocompatibles, de porosidad estructurada compuestas por monetita porosa, en adelante matrices de la invención, que comprende matrices tridimensionales de monetita de porosidad estructurada, correspondiente a macroporos cilíndricos de entre 350-650 μm de diámetro, separados uniformemente entre 0,4-0,6 mm entre sí. Dicha monetita presenta la porosidad intrínseca del material, sobre la que se induce la macroporosidad estructurada indicada.

55

En las matrices de la invención, dicha porosidad estructurada se distribuye en el área máxima de la matriz que permita que dicha matriz mantenga su estabilidad mecánica de forma estable. En una realización particular, dicha área máxima es la restante de eliminar la zona perimetral exterior de la matriz, que oscila entre 0,1 y 0,9 mm de anchura, preferiblemente 0,5 mm de anchura.

60

Así, los materiales que se emplean en osteogénesis deben imitar la morfología, estructura y función del hueso para conseguir una correcta integración en el tejido del hospedador.

Está comprobado que la estructura determinada por la porosidad y el diámetro de poro de los materiales usados en regeneración ósea influye en la formación del hueso tanto *in vitro* como *in vivo*. Los poros son necesarios para que se dé la formación de tejido óseo, ya que permiten la migración y la proliferación de los osteoblastos y células mesenquimatosas y también la vascularización. Así, el material de la invención proporciona las condiciones necesarias para conseguir la correcta regeneración del hueso gracias a sus características de porosidad que permiten la colonización y proliferación de los tipos celulares necesarios para tal efecto.

Los resultados *in vitro* llevados a cabo con matrices de otros materiales muestran que, una baja porosidad estimula la osteogénesis ya que se produce agregación celular lo que suprime la proliferación estimulando la osteogénesis. Estos mismos experimentos muestran que una elevada porosidad no afecta a la adhesión celular pero sí aumenta la proliferación ya que hay un aumento de la superficie de contacto y también se facilita el transporte de oxígeno y nutrientes (Takahashi *et al.*, 2004). Según estos resultados, la osteogénesis no se ve afectada por el tamaño de poro pero sí aumenta con un número bajo de poros.

Por otro lado, *in vivo*, se requiere una integración y penetración de las células en el material así como la vascularización del mismo, para que se incorpore al tejido del individuo. Una elevada porosidad y tamaño de poro, como la proporcionada por las matrices de la invención facilita estos requisitos.

Inicialmente, según primeros estudios el diámetro mínimo requerido para la formación de hueso se consideraba en torno a 100 μm , para que pudieran llevarse a cabo los procesos de migración y transporte celular. Sin embargo, en la actualidad, se proponen diámetros superiores a 300 μm ya que la presencia de estos macroporos aumenta la formación de hueso debido a que permiten la formación de capilares en su interior. La vascularización afecta al desarrollo de la osteogénesis. Los poros con diámetros pequeños favorecen condiciones de hipoxia y no inducen osteogénesis sino condrogénesis.

Así, los poros largos y grandes en forma de túnel de la matriz de la invención permiten su vascularización y el desarrollo de la osteogénesis.

Además, los poros con diámetros elevados aumentan la superficie de contacto, lo que aumenta también la superficie de interacción con el tejido hospedador, lo que va a acelerar la degradación que realizan los macrófagos.

En el caso de matrices amorfas, que presentan una geometría de porosidad aleatoria, la red vascular que se pueda llegar a formar es irregular en la estructura del biomaterial y no podrá conectar con la red vascular del hueso, de manera que el implante no podrá integrarse de forma eficaz con el tejido del receptor.

Sin embargo, la estructura de porosidad adoptada por las matrices de la presente invención tiene en cuenta la incorporación de poros con el tamaño adecuado para que convivan las especies celulares requeridas y se pueda formar un entramado óseo y vascular en todo el implante y además se permita la conexión con la zona receptora, para que se pueda dar lugar la integración tisular.

El nuevo diseño incorpora macroporos de 350 μm -650 μm en forma cilíndrica (en forma de túnel), que atraviesan totalmente la estructura del material, para una colonización celular adecuada (en cuanto a diferentes tipos celulares y a número suficiente de cada tipo) de las células de los tejidos adyacentes, así como una integración con el tejido receptor. Además, en toda la estructura contiene una red de microporos, para una suficiente difusión de nutrientes, gases y productos de desecho del metabolismo celular.

Tal y como se observa en las figura 13 la ventaja en cuanto a la colonización celular de las matrices de la invención puede verse reflejada en estudios directos de visualización celular al microscopio electrónico de barrido. Sin embargo, tal y como se muestra en la figura 14, los biomateriales amorfos, que muestran una distribución de macroporos desestructurada y no predefinida, producidos en el proceso de obtención del cemento de la presente invención, presentan poros que no conectan la estructura interna. Es decir, el número de macroporos es insuficiente y su distribución inapropiada para que se pueda dar una colonización adecuada de las células, quedando estas relegadas en su mayoría a la superficie del material.

El éxito en el proceso de formación de un nuevo hueso está directamente relacionado con la cantidad de células formadoras de hueso que intervengan en el proceso, así como en la formación de una consistente red vascular por todo el biomaterial. Así, tal y como se muestra en la figura 14 las matrices de material de porosidad estructurada de la invención, que presentan una distribución espacial y configuración espacial de macroporos ordenada, inducida y previamente establecida, permiten una amplia colonización celular por todo el biomaterial, una mayor difusión de nutrientes y de moléculas de señalización que van a determinar el comportamiento celular.

Por lo tanto, las matrices de la invención, con un porcentaje elevado de porosidad, especialmente de macroporosidad, en el que hay poros con diámetros elevados (>300 μm , en concreto entre 350 y 650 μm , y

preferentemente $500 \pm 60 \mu\text{m}$) y en forma de túneles continuos, aumentará la osteointegración del implante después de la cirugía.

5 En un segundo aspecto, la presente invención hace referencia al método de síntesis de las matrices de la invención, que comprende la formación de una matriz de monetita de porosidad estructurada que comprende:

- Formación de una fase sólida, correspondiente a una matriz porosa de brushita mediante la utilización combinada de porógenos, retardante y métodos mecánicos durante la reacción de fraguado entre un fosfato cálcico ácido y un fosfato cálcico básico.
- 10 - Mezcla de la fase sólida con agua destilada para dar lugar a la fase líquida.
- Aplicación en el cemento obtenido en la etapa 2, de uno o más moldes, uno de ellos con punzones cilíndricos, que presentan un diámetro de entre 350 y $650 \mu\text{m}$, y más preferentemente $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, durante el fraguado para generar en las matrices poros cilíndricos verticales de entre 350 y $650 \mu\text{m}$, y más preferentemente $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ de diámetro separados entre $0,4$ - $0,6$ mm y más preferentemente separados por $0,5$ mm $\pm 60 \mu\text{m}$ de distancia.
- 15 - Esterilización de la brushita porosa y transformación térmica a monetita porosa.

20 En concreto, en el método de síntesis empleado, el producto obtenido en la etapa 1, da lugar a una fase sólida que se mezcla con agua destilada para dar lugar a una fase líquida. Como realización preferente, la invención propone el uso de fosfato tricálcico-beta como fosfato cálcico básico, y monofostato cálcico como fosfato ácido.

25 Según la invención, para llevar a cabo la mezcla, la relación molar de fosfato básico/fosfato ácido es de $1,6$ - $1,8$ durante un tiempo de aproximadamente 10 minutos, la concentración de porógeno 1 - 20 % en peso y la de retardante entre $0,4$ - $0,6$ % en peso; preferentemente relación molar de fosfato básico/fosfato ácido de $1,785$, concentración de porógenos 3 - 10 % en peso y la de retardante es $0,54$ % en peso.

30 La relación molar de fosfato básico/fosfato ácido para llevar a cabo la mezcla es de $1,6$ - $1,8$; preferentemente $1,785$; durante un tiempo de aproximadamente 10 minutos. El carbonato cálcico se añade en concentraciones entre 1 - 20 % en peso, preferiblemente entre 3 - 10 %. Como retardante de la reacción de fraguado la invención propone el empleo de pirofosfatosódico en una proporción del $0,4$ - $0,6$ % en peso, siendo $0,54$ % la opción preferencial.

Esta fase sólida así obtenida es mezclada con la fase líquida (agua destilada), en una relación (P/L) de 3.

35 Con respecto a fosfatos cálcicos ácidos y básicos, porógenos y retardantes a emplear en la invención, el experto en la materia conoce los distintos posibles compuestos y combinaciones a emplear.

Con la pasta obtenida se rellenan moldes que permiten obtener las matrices de la invención, que presentan la distribución de poros estructurada anteriormente indicada.

40 El molde de la invención, empleado para el desarrollo del biomaterial se refiere a cualquier molde que presente punzones cilíndricos, cuya base presente un diámetro de entre 350 y $650 \mu\text{m}$, y que estén separados entre sí entre $0,4$ y $0,6$ mm. Dicho molde puede estar construido en silicona, metal, material plástico resistente o cualquier tipo de material que le permita ser aplicado en su uso.

45 El molde puede presentar cualquier forma deseada, en función de la forma y tamaño de biomaterial que se requiera para reparar un defecto óseo particular para cada paciente, manteniendo siempre el biomaterial obtenido las características de porosidad características del biomaterial de la invención, es decir macroporos cilíndricos de diámetro de entre 350 y $650 \mu\text{m}$, más preferentemente $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ de diámetro, separados uniformemente entre sí entre $0,4$ y $0,6$ mm, más preferiblemente $0,5$ mm $\pm 60 \mu\text{m}$, además de la porosidad intrínseca del biomaterial.

50

Dichos moldes permiten la obtención de las matrices de la invención, en las que la porosidad estructurada se distribuye en el área máxima de la matriz que permita que dicha matriz mantenga su estabilidad mecánica de forma estable.

55

En una realización particular, dichos moldes permiten la obtención de matrices en las que el área máxima en la que se distribuye la porosidad estructurada es el área restante de eliminar la zona perimetral exterior de la matriz, de entre $0,1$ y $0,9$ mm de anchura, preferiblemente $0,5$ mm de anchura.

60 La invención también contempla el uso de más de un molde:

- Un primer molde que permita la obtención de las matrices de monetita, en la forma deseada pero sin la porosidad estructurada

- Un segundo molde que, en una superficie plana presenta punzones cilíndricos, de diámetro de entre 350 y 650 μm , preferentemente 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, y que estén separados entre sí entre 0,4 y 0,6 mm, preferentemente 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$. Dicho segundo molde, debe ser aplicado, tras retirar el primer molde, introduciendo en él las piezas obtenidas con el primer molde. El segundo molde es tapado con una tapa según se muestra en la figura 1c.

Así, el biomaterial de la invención puede presentarse en forma de pastillas, láminas, cilindros, etc., y cualquier otra forma que sea útil para reparar un defecto óseo particular de un paciente.

- 10 En un aspecto preferente de la invención, el molde presenta la forma de una pastilla o cilindro de diámetro entre 2 y 50 mm, preferiblemente entre 2 y 15 mm y de altura entre 1 y 50 mm, preferiblemente entre 1 y 5 mm, y más preferiblemente:
- de diámetro 10 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm, que presenta 64 punzones, o
 - de diámetro 8 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm, que presenta 39 punzones, o
 - 15 - de diámetro 7 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm, que presenta 28 punzones, o
 - de diámetro 5 mm y altura 3 mm, que presenta 12 punzones.

En todos los casos, los punzones son cilíndricos de diámetro 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, y distribuidos respetando una zona perimetral de 5 mm (tomado desde el borde de la pastilla) sin punzones.

20 Un minuto después de iniciar el fraguado del cemento, este se dispone durante aproximadamente 30 minutos en el molde, antes de que finalice su solidificación, y se retira, habiéndose formado los poros determinados por el molde. Una vez ha fraguado totalmente, la matriz de brushita formada se somete a autoclavado entre 120 y 130 °C durante 24-25 minutos, produciéndose su conversión a monetita, completamente esterilizada y apta para su uso.

25 En otro aspecto preferente de la invención, un primer molde es de silicona y presenta huecos cilíndricos para pastillas o cilindros del tamaño de las matrices de la invención que se desea fabricar. En una realización particular de la invención, dichos huecos presentan diámetro entre 2 y 50 mm, preferiblemente entre 2 y 15 mm y altura entre 1 y 50 mm, preferiblemente entre 1 y 5 mm, y más preferiblemente:

- diámetro 10 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm,
- diámetro 8 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm,
- diámetro 7 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm,
- diámetro 5 mm y altura 3 mm.

35 Dichos moldes no intervienen en la formación de los macroporos.

40 En este aspecto de la invención, el segundo molde es metálico, presenta la dimensión de cada una de las piezas anteriores, y en su base, distribuidos uniformemente, presenta punzones cilíndricos de 500 micras $\pm 60 \mu\text{m}$, separados entre sí 500 micras $\pm 60 \mu\text{m}$, que dan lugar al componente macroporoso de las matrices de monetita, distribuidos respetando una zona perimetral mínima de 0,5 mm (tomado desde el borde de la pastilla) sin punzones. En una realización particular, dichos moldes metálicos presentan diámetro entre 2 y 50 mm, preferiblemente entre 2 y 15 mm y altura entre 1 y 50 mm, preferiblemente entre 1 y 5 mm, y más preferiblemente:

- 45 - diámetro 10 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm, y 64 punzones o
- diámetro 8 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm, y 39 punzones o
- diámetro 7 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 o 5 mm, y 28 punzones o
- diámetro 5 mm y altura 3 mm, y 12 punzones.

50 En todos los casos respetando una zona perimetral mínima de 0,5 mm (tomado desde el borde del cilindro) sin punzones.

55 En este caso, el procedimiento es igual que el anterior, con la diferencia de que inmediatamente después de realizar la mezcla de la fase sólida y la líquida, se rellena el primer molde de silicona. Antes de que el biomaterial finalice su fraguado, se retiran las piezas del molde de silicona. Posteriormente se introducen las piezas en el molde metálico con punzones (tapándose con la tapa metálica según la figura 1c), hasta que finaliza el fraguado en un baño de agua a 37 °C durante 30 minutos. Una vez solidificado, se retiran del molde metálico obteniendo las piezas cilíndricas con la porosidad determinada. Las matrices formadas se someten a autoclavado entre 120 y 130 °C durante 24-25 minutos, produciéndose su conversión a monetita, completamente esterilizada y apta para su uso. El empleo de estos moldes da lugar a pastillas de monetita de porosidad estructurada. En una realización particular, dichas pastillas presentan diámetro entre 2 y 50 mm, preferiblemente entre 2 y 15 mm y altura entre 1 y 50 mm, preferiblemente entre 1 y 5 mm, y más preferiblemente:

- diámetro 10 mm y altura de 3 a 5 mm preferentemente 3 mm o 5 mm, que presentan una distribución uniforme de 64 macroporos de diámetro $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- diámetro 8 mm y altura de 3 a 5 mm, preferiblemente 3 mm o 5 mm, que presenta 39 macroporos de diámetro $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- 5 - diámetro 7 mm y altura de 3 a 5 mm preferentemente 3 mm o 5 mm que presenta 28 macroporos de diámetro $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- diámetro 5 mm y altura 0,3 mm que presenta 12 macroporos de diámetro $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.

10 En todos los casos, las pastillas de monetita presentan una zona perimetral mínima de 0,5 mm (tomado desde el borde de la pastilla) sin macroporos que les permite mantener las condiciones de estabilidad mecánica y fortaleza necesarias para ser empleadas en sus aplicaciones.

15 Así, la distribución final de macroporos en dichas pastillas respeta tanto la zona perimetral mínima de 0,5 mm sin macroporos, así como el tamaño y distancia entre poros (según lo descrito anteriormente).

Los productos de la presente invención encuentran aplicación en el campo de la ingeniería tisular, y regeneración ósea. Así las matrices de monetita de la invención, obtenidas a través de los moldes definidos son de aplicación para el soporte y crecimiento de células y las aplicaciones anteriormente definidas.

20 En una realización particular, las pastillas de la invención son aplicadas en forma de varias unidades (como un conjunto de piezas), disponiéndose de manera que se adaptan completamente al espacio del defecto óseo, facilitando la entrada homogénea de nutrientes, gases y células en toda la zona a reparar, facilitando su recuperación gracias a dicha disposición y evitando que se den zonas necróticas.

25 En un aspecto preferido la invención hace referencia al uso de las matrices de la invención como soporte de crecimiento para células mesenquimatosas de distintos orígenes, incluido origen adiposo, osteoblastos, células endoteliales y combinaciones de células madre mesenquimatosas adultas no diferenciadas o diferenciadas hacia la estirpe osteoblástica o endotelial, osteoblastos, osteoclastos, osteocitos de hueso y células endoteliales, para su empleo en regeneración ósea.

30 Las matrices de monetita de porosidad estructurada de la invención, se reabsorben *in vivo* en mayor tiempo y modo similar que el DCPD, evitando el inconveniente de su transformación en HA (como muestra el ejemplo 10 donde se comparan las matrices de porosidad estructurada de la invención frente a matrices de brushita realizadas con la porosidad estructurada de las matrices de la presente invención). Así, dichas matrices se disolverán a pH fisiológicos, de manera gradual en los tejidos extracelulares que envuelven el implante y las propias células que lo colonizan, (células endoteliales, osteoclastos, osteoblastos, macrófagos...) serán los responsables de su eliminación o reutilización como sucede en el hueso. Además, su combinación con Carbonato Cálculo, en el proceso de su obtención, evita su transformación a HAP.

40 Tal y como sucede con el DPCD, su reabsorción comienza entre la 4ª y 8ª semana, periodo de tiempo que es adecuado para que las células adyacentes colonicen el material y puedan reemplazar el material reabsorbido por matriz ósea fisiológica. Esta biodegradabilidad está ajustada a lo que ocurre en el organismo, en donde el crecimiento óseo en los defectos puede tener lugar en un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 6 meses, dependiendo del tipo de hueso y del tamaño del defecto (Francone V. 2004).

45 Además de la biodegradabilidad, otras propiedades como la rugosidad y textura del material de la invención se han tenido en cuenta en el estudio de las matrices. Así, según las pruebas biológicas realizadas a las matrices de monetita porosa con macroporosidad estructurada de la invención, se demuestra una adhesión al material superior al 95 %, donde las células no cambian su morfología en contacto con el material, y colonizan toda la superficie comunicándose entre ellas como en cualquier tejido funcional.

50 Hay que tener en cuenta que la monetita puede mostrar resistencia y elasticidad muy baja con respecto a la del hueso trabecular (elasticidad 50-100 MPa y compresión 5-10 MPa). Sin embargo, sería casi imposible igualar las propiedades mecánicas del hueso. Y, se ha demostrado que es suficiente con que el material alcance propiedades mecánicas suficientes para soportar el crecimiento celular, ya que las células, al invadir el material formarán la fase orgánica del implante y mejorarán las propiedades mecánicas. Las matrices de monetita porosa de la invención, cumplen con este requisito.

60 El material monetita es reabsorbible, bioactivo, presenta características similares al hueso. Este material permite el crecimiento celular tanto en su superficie como en su interior, una vez en el defecto óseo, permitirá que las células (endoteliales, osteoblastos, osteoclastos...) formen el andamio necesario que se conectará al hueso sano. Posteriormente la monetita se irá eliminando poco a poco, sin sufrir transformación a Hidroxi apatito, por acción de los osteoclastos, y los osteoblastos irán sintetizando la nueva fase mineral que irá sustituyendo la

monetita, eliminando por completo el defecto inicial.

5 Así, un primer objeto de invención se refiere a una matriz tridimensional de monetita de porosidad estructurada caracterizada por presentar en su estructura macroporos cilíndricos verticales de entre 350 y 650 μm de diámetro, que atraviesan longitudinalmente la matriz de un extremo a otro, existiendo una separación de entre 0,4-0,6 mm entre cada macroporo. En una realización particular el diámetro de los macroporos es de preferentemente 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$. En otra realización particular, la separación entre macroporos es de preferentemente 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$.

10 Otro objeto de invención se refiere a la matriz de monetita de porosidad estructurada cuyo contenido en monetita es al menos del 90 %, preferentemente 95 % y más preferentemente 100 %.

15 Un siguiente objeto de invención lo constituyen las matrices de monetita de porosidad estructurada caracterizadas por ser obtenidas por transformación térmica de un material precursor. En una realización particular, dicho material precursor que es transformado térmicamente a monetita consiste en una mezcla de una fase sólida compuesta por fosfatos cálcicos básicos, fosfatos cálcicos ácidos, un porógeno y un retardante que es fraguada por adición de agua destilada. En otra realización particular, la relación molar de fosfato básico/ fosfato ácido es de 1,6-1,8, la concentración de porógenos 1-20 % en peso, la de retardante entre 0,4-0,6 % en peso y la proporción (P/L) es de 3. En otra realización particular, la relación molar de fosfato básico/ fosfato ácido es de 1,785, la concentración de porógenos 3-10 % en peso y la de retardante es 0,54 % en peso. En otra realización particular el fosfato cálcico ácido es monofosfato cálcico, el fosfato cálcico básico es fosfato tricálcico beta, el agente porógeno carbonato cálcico y el retardante es pirofosfato sódico. En otra realización particular el material precursor es brushita.

25 Otro objeto de invención lo constituyen las matrices tridimensionales de monetita de porosidad estructurada según reivindicaciones anteriores caracterizada porque pueden adoptar cualquier tipo de forma requerida para la reparación de un defecto óseo o tisular particular. En una realización particular, dicha matriz consiste en un cilindro con diámetro de base entre 2 y 50 mm, y de altura entre 1 y 50 mm. En otra realización particular dicho cilindro presenta diámetro de base entre 2 y 15 mm, y altura entre 1 y 5 mm. En otra realización particular, dicho cilindro presenta una zona perimetral mínima de 0,5 mm sin macroporos. En otras realizaciones particulares, el cilindro presenta:

- diámetro 10 mm, altura de 5 mm, y 64 macroporos cilíndricos con diámetro de 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí que atraviesan longitudinalmente la matriz.
- diámetro 10 mm, altura de 3 mm, y 64 macroporos cilíndricos con diámetro de 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí que atraviesan longitudinalmente la matriz.
- diámetro 8 mm, altura de 5 mm, y 39 macroporos cilíndricos con diámetro 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí que atraviesan longitudinalmente la matriz.
- diámetro 8 mm, altura de 3 mm, y 39 macroporos de diámetro 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí que atraviesan longitudinalmente la matriz.
- diámetro 7 mm, altura de 5 mm, y 28 macroporos de diámetro 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí que atraviesan longitudinalmente la matriz.
- diámetro 7 mm, altura de 3 mm, y 28 macroporos de diámetro 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí que atraviesan longitudinalmente la matriz.
- diámetro 5 mm, altura 3 mm, y 12 macroporos de diámetro 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí que atraviesan longitudinalmente la matriz.

50 En todos ellos respetando una zona perimetral de 0,5 mm desde el borde de dicho cilindro hacia el centro del mismo, que queda sin macroporos. El molde para la preparación de una matriz tridimensional según los objetos de invención anteriores se caracteriza por presentar una distribución homogénea de punzones de 350-650 μm de diámetro separados uniformemente entre 0,4-0,6 mm entre sí. Dicho molde puede estar compuesto por silicona, metal, plástico resistente o cualquier otro material que permita su aplicación, pudiendo adoptar cualquier tipo de forma requerida.

55 En una realización particular, el molde presenta forma cilindro con diámetro de base entre 2 y 50 mm y de altura entre 1 y 50 mm. En otra realización particular dicho cilindro presenta diámetro de base entre 2 y 15 mm y de altura entre 1 y 5 mm. En otras realizaciones particulares, dicho cilindro presenta:

- diámetro 10 mm, altura de 5 mm, y 64 punzones cilíndricos con diámetro de base de 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados 0,5 mm $\pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- diámetro 10 mm, altura de 3 mm, y 64 punzones cilíndricos con diámetro de base de 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados 0,5 mm $\pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- diámetro 8 mm, altura de 5 mm, y 39 punzones cilíndricos con diámetro de base de 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados 0,5 mm $\pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.

- diámetro 8 mm, altura de 3 mm, y 39 punzones cilíndricos con diámetro de base de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- diámetro 7 mm, altura de 5 mm, y 28 punzones cilíndricos con diámetro de base de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- 5 - diámetro 7 mm, altura de 3 mm, y 28 punzones cilíndricos con diámetro de base de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- diámetro 5 mm, altura 3 mm, y 12 punzones cilíndricos con diámetro de base de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
-
- 10 Distribuidos en todos ellos respetando un área perimetral de 0,5 mm de ancho sin punzones, tomado desde el borde hacia el interior del cilindro.

Un siguiente objeto de invención se refiere al método de síntesis de las matrices tridimensionales de monetita de porosidad estructurada caracterizado por comprender las etapas de:

- 15 1) mezcla de una fase sólida compuesta por fosfatos cálcicos básicos, fosfatos cálcicos ácidos, un porógeno y un retardante. Que es fraguado por adición de agua destilada, dando lugar a la fase líquida,
- 2) aplicación de al menos un molde en el cemento durante el fraguado para generar macroporos cilíndricos verticales de entre 350 y $650 \mu\text{m}$ de diámetro, separados uniformemente $0,4-0,6 \text{ mm}$ entre sí,
- 20 3) esterilización del material precursor formado y transformación térmica a monetita.

En una realización particular, en la etapa 1 del método, la relación molar de fosfato básico/ fosfato ácido es de 1,6-1,8, la concentración de porógeno es 1-20 % en peso, la de retardante entre 0,4-0,6 % en peso y la proporción (P/L) es de 3. En otra realización particular, la relación molar de fosfato básico/ fosfato ácido es de 1,785, la concentración de porógenos 3-10 % en peso y la de retardante es 0,54 % en peso. En otra realización particular, el fosfato cálcico ácido es monofosfato cálcico, el fosfato cálcico básico es fosfato tricálcico beta, el agente porógeno carbonato cálcico y el retardante es pirofosfato sódico. En otra realización particular, el producto de la fase 1 es brushita.

En otra realización particular, en la etapa 3 del método, la esterilización térmica se lleva a cabo por autoclavado. En otra realización particular, dicho autoclavado se lleva a cabo a $120-130 \text{ }^\circ\text{C}$ y durante 24-25 minutos.

En otra realización particular, en la etapa 2 del método, el molde empleado es el molde descrito en los objetos de invención anteriores. En otra realización particular, previo al empleo de dichos moldes, se emplea un molde de silicona que presenta forma de cilindro con diámetro de base entre 2 y 50 mm, y de altura entre 1 y 50 mm. En otra realización particular, dicho molde de silicona presenta diámetro de base entre 2 y 15 mm y altura entre 1 y 5 mm.

Otro objeto de invención lo constituye el uso del molde descrito en los objetos de invención anteriores, para la obtención de fosfatos cálcicos que adopten su forma. En una realización particular, dicho fosfato de calcio consiste en monetita.

Otro objeto de invención se refiere a las matrices tridimensionales de monetita de porosidad estructurada caracterizadas porque adicionalmente comprenden células. En una realización particular, dichas células son células mesenquimatosas, osteoblastos, osteoclastos, osteocitos, células endoteliales o combinaciones de ellas.

Otro objeto de invención se refiere al uso de las matrices tridimensionales de monetita de porosidad estructurada con o sin células, para la preparación de un agente terapéutico para la regeneración de estructura ósea. En una realización particular, dicha regeneración de estructura ósea se lleva a cabo para combatir la osteoporosis.

Descripción de los dibujos

50 Figura 1: a) Piezas de metal fijadas en una placa de cristal del mismo tamaño que los cilindros de monetita que se quieren sintetizar b) Moldes de silicona obtenidos a partir de las piezas de la figura 1a), con los huecos del tamaño de las piezas que se van fabricar, sin tener en cuenta por ahora la formación de los macroporos c) Molde de metálico con punzones metálicos que van a dar lugar a una macroporosidad controlada y homogénea en la matriz de monetita.

55 Figura 2: Diseño de un ejemplo de molde utilizado para la obtención de la matriz de monetita, con una distribución homogénea de poros verticales de $500 \pm 60 \text{ mm}$, de diámetro, regularmente espaciados y de forma reproducible.

60 Figura 3: Fotografía de una de las formas de matriz de monetita porosa vista de alzado (a) y de perfil (b). En esta imagen se pueden apreciar los poros cilíndricos de igual tamaño, distribuidos de forma regular por la estructura de la matriz y cómo estos poros atraviesan completamente la estructura.

Figura 4: Realizaciones particulares de los monómeros/pastillas de la invención y sus dimensiones a) pastilla de 5 mm de diámetro (ϕ) y 3 mm de altura (h) con un total de 12 macroporos de 0,5 mm de diámetro distanciados ($\phi.m$) entre sí por 0,5 mm (d.m) b) pastilla de 10 mm de diámetro (ϕ) y 3 o 5 mm de altura (h), con un total de 64

macroporos de 0,5 mm de diámetro (ϕ .m) distanciados entre sí por 0,5 mm (d.m) c) pastilla de 8 mm de diámetro (ϕ) y 3 o 5 mm de altura (h) con un total de 39 macroporos de 0,5 mm de diámetro (ϕ .m) distanciados entre sí por 0,5 mm (d.m) y d) pastilla de 7 mm de diámetro (ϕ) y 3 o 5 mm de altura (h) con un total de 28 macroporos de 0,5 mm de diámetro (ϕ .m) distanciados entre sí por 0,5 mm (d.m). Todas ellas respetan la zona perimetral de 0,5 mm de ancho sin macroporos.

Figura 5: Difracción de rayos X de la brushita porosa precursora (antes del tratamiento térmico) y monetita porosa (después del tratamiento térmico) obtenida tras el proceso de transformación y esterilización del material. Los 3 picos más altos que aparecen en el gráfico de difracción de rayos X, definen en el caso del gráfico superior (a) a la brushita y en el gráfico inferior (b) son característicos de la monetita. El análisis estructural de las muestras (análisis de Rietvel) después de la esterilización con autoclave muestra que el material consta principalmente de monetita $95 \pm 5\%$ y el resto es fosfato tricálcico β (también denominado β -TCP). Para establecer la composición del material el diagrama de difracción del biomaterial se comparó con diagramas modelo de brushita (ICSD 016132) y de monetita (ICSD 38128).

Figura 6: Imágenes frontal (a) y lateral (b) de la matriz de monetita amorfa, es decir, sin la porosidad estructurada. La porosidad que se aprecia es inherente al proceso de obtención, la mayoría de la porosidad del biomaterial lo componen microporos, en los que no puede llevarse a cabo la colonización celular. (c) Imagen del diseño de la matriz de monetita de la invención con los poros de tamaño definido en torno a los $500 \mu\text{m}$, distribuidos en la estructura del biomaterial.

Figura 7: Imágenes de microscopía electrónica de barrido a diferentes aumentos, del biomaterial de monetita sin porosidad controlada. En estas imágenes se aprecia un biomaterial fundamentalmente microporoso (c) y con la presencia mínima de algunos macroporos (b) dispuestos de forma aleatoria, a modo de oquedades, que en ningún caso llegan a atravesar la matriz (a, b).

Figura 8: Imagen de microscopía electrónica de barrido en la que se observa el biomaterial de monetita de la invención con poros de $500 \mu\text{m}$ distribuidos por la matriz.

Figura 9: Gráfica del estudio de citotoxicidad del biomaterial monetita de la invención en las células L929. Del ensayo MTT se observa que no existen diferencias significativas en la proliferación de las células L929 entre aquellas que han estado en contacto con la monetita y las que no, lo que permite concluir que la monetita de porosidad estructurada de la invención no es citotóxica.

Figuras 10: Imágenes de microscopía invertida de contraste de fases obtenidas del ensayo "Mouse Lymphoma assay". Como resultado del ensayo se muestran imágenes representativas de pocillos considerados como (a) y (b) positivos (células mutantes, crecimiento de colonias) o (c) y (d) como negativos (células no mutantes, ausencia de colonias).

Figura 11: Histograma de las frecuencias de mutación de la monetita de porosidad estructurada de la invención en presencia (monetita + S9) y ausencia (monetita) de activación metabólica. Dichas frecuencias comparadas con los controles negativos y positivos empleados en presencia y ausencia de activación metabólica nos permite concluir que la monetita de porosidad estructurada de la invención no es un biomaterial mutagénico.

Figura 12: Determinación de la hemocompatibilidad del biomaterial de monetita de la invención. Los medios de cultivos de osteoblastos y AMSC que estuvieron durante 24 h en contacto con la monetita de la invención fueron empleados para determinar el porcentaje de hemólisis frente a controles positivos y negativos. A partir de la gráfica se puede concluir que la monetita de la invención es un biomaterial hemocompatible.

Figura 13: Imágenes de microscopía electrónica de barrido a distintos aumentos de una matriz de monetita de macroporosidad estructurada según la invención. Los macroporos permiten a las células madre mesenquimatosas colonizar la superficie del biomaterial (a) e introducirse por dichos macroporos (b, d). En (c) observamos el corte longitudinal de un macroporo. (c) Las células interactúan entre ellas emitiendo prolongaciones citoplasmáticas, al igual que ocurre en un tejido a nivel fisiológico.

Figura 14: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las células madre mesenquimatosas dispuestas en el biomaterial de monetita de porosidad no controlada. Se puede apreciar que las células se disponen en la superficie de la matriz, sin posibilidad de colonizar su interior, puesto que tienen un tamaño significativamente mayor que la microporosidad que caracteriza al biomaterial.

Figura 15: Proliferación de las células madre mesenquimatosas dispuestas sobre el material de monetita con porosidad no controlada (gris) frente a las dispuestas sobre el biomaterial de monetita de porosidad estructurada de la invención (negro).

Figura 16: Esquema morfológico del tejido óseo: 1. Hueso cortical. 2. Hueso trabecular. 3 Sistema de Havers. 4 Vaso sanguíneo. 5 Canal de Havers. 6 Canal de Volkmann. 7 Periostio. 8 Revestimiento óseo. 9 Vasos del periostio. 10 Osteoclastos. 11 Osteoblasto. 12 Osteocitos.

Figuras 17 y 18: Imágenes de SEM en la que se puede observar a $\times 40$ aumentos y a $\times 80$ aumentos como diferentes concentraciones de AMSC prediferenciadas hacia hueso se disponen sobre una misma superficie del biomaterial de la invención. Las figuras 17a y b hacen referencia al biomaterial sin células, las figuras 17 c-h son relativas a las distintas concentraciones celulares empleadas desde $0,5 \times 10^6$ hasta 2×10^6 células. Las figuras 18 a-h hacen referencia a las concentraciones celulares empleadas desde 3×10^6 hasta 6×10^6 células.

Figura 19: Imágenes de microscopía confocal de las células sobre (a) la superficie del biomaterial de monetita de porosidad estructurada de la invención y (b) en el interior de los canales del macroporo de dicho biomaterial tras varios días en cultivo. En las imágenes de (b) se observan los núcleos de AMSC prediferenciadas en el interior de los poros del biomaterial (la reconstrucción del poro en su totalidad se realiza mediante el montaje de

imágenes seriadas). A partir de estas imágenes se observa como se produce un aumento de células en la superficie del biomaterial así como las paredes de los macroporos a medida que el tiempo de cultivo aumenta.

Figuras 20 y 21: Imágenes cenitales de SEM a distintos aumentos de las células AMSC prediferenciadas en el biomaterial a distintos tiempos de asociación (1, 4, 7, 10 y 15 días en la superficie del biomaterial (figuras 20 a-e respectivamente) y en el interior de los canales de los macroporos del biomaterial (figuras 21 a-e respectivamente).

Figura 22 y 23: Análisis de la expresión de los genes implicados en la osteogénesis en AMSC como osteonectina (OTN), osteocalcina (OCA), osteopontina (OPN), colágeno tipo 1 (COL-1), TGF- β 1 y fosfatasa alcalina (FA), mediante RT-PCR en células AMSC sin diferenciar (figura 22) y prediferenciadas (figura 23) solas y asociadas al biomaterial durante 4, 7, 10 y 15 días. A la vista de los geles se puede concluir que tanto las células indiferenciadas como prediferenciadas no ven modificadas la expresión de los genes implicados en la osteogénesis y que por lo tanto, mantienen su estado funcional orientado hacia la formación de células óseas, capaces de sintetizar matriz extracelular que sustituya el biomaterial que se va degradando para regenerar el defecto óseo.

Figura 24: Imágenes de microscopía confocal del inmunomarcaje. La figura 24 indica las observaciones que deben realizarse en la lectura de cada una de las siguientes figuras 25 a 31. Así, tal y como se observa, la figura 24 se encuentra dividida en 4 cuadrantes: el cuadrante superior izquierdo (i) hace referencia a la tinción de los núcleos de las células, el cuadrante superior derecho (ii) se refiere a al marcaje de solo la proteína, el cuadrante inferior izquierdo (iii) hace referencia a la doble tinción de núcleos celulares + proteína y el cuadrante inferior derecho (iv) se refiere a la triple tinción en la que se observan los núcleos celulares + proteína + biomaterial. En las figuras 25-31, cada una de las figuras a-f también están subdivididas con los cuadrantes mencionados, debiendo interpretarse en cada uno de ellos la información indicada.

Figuras 25- 26: Imagen de microscopía confocal del inmunomarcaje del COL-1 de las AMSC prediferenciadas en la superficie (topview, figura 25) y en el interior de los canales (sideview, figura 26) del biomaterial a distintos tiempos de cultivo.

Figura 27-28: Imagen de microscopía confocal del inmunomarcaje del Osteocalcina en las AMSC prediferenciadas en la superficie (topview, figura 27) y en el interior de los canales (sideview, figura 28) del biomaterial a distintos tiempos de cultivo.

Figuras 29-30: Imagen de microscopía confocal del inmunomarcaje del osteopontina en las AMSC prediferenciadas en la superficie (topview, figura 29) y en el interior de los canales (sideview, figura 30) del biomaterial a distintos tiempos de cultivo.

Figura 31: Imagen de microscopía confocal del inmunomarcaje de colágeno tipo-1, osteocalcina y osteopontina en las AMSC prediferenciadas, creciendo sobre la superficie del biomaterial (topview figura 31 a-c) y en el interior de los canales (sideview, figura 31 d-f) durante 4 días. Estos resultados indican que las MSC prediferenciadas que se encuentran en el biomaterial son capaces de sintetizar y secretar proteínas relacionadas con la síntesis ósea.

Figuras 32 y 33: Análisis de elementos fundamentales por SEM-EDX del biomaterial y las AMSC asociadas a la monetita de porosidad estructurada de la invención durante 4 y 7 días (figura 32) y 10 y 15 días (figura 33). Las imágenes de la columna izquierda se refieren a las zonas puntuales en el centro de los canales a partir de los cuales se han realizado los análisis de los elementos presentes en las células (imágenes de la columna derecha). Los gráficos indican una distribución de elementos distinta a la encontrada en el biomaterial. Así se produce un aumento de la síntesis de las partículas (Calcio, fósforo y silicio) por parte de las células a lo largo del tiempo en asociación con el biomaterial de porosidad estructurada de la invención. Se concluye por tanto, que se dan las condiciones adecuadas para la formación de las sales de calcio necesarias para que se forme la fase mineral del hueso.

Figura 34: Imagen de SEM-EDX en la que se muestra la distribución de los elementos básicos en un área en la que solo se encuentran AMSC. En las imágenes del Calcio y Fósforo, se pueden apreciar las partículas electrodensas, formadas por los dos elementos (se encuentran en la misma localización del área).

Figura 35: Secreción de TGF- β 1 (pg/ml), obtenida de diferentes concentraciones de células prediferenciadas creciendo sin monetita durante 7 días en cultivo. Se observa un aumento gradual en la concentración de TGF- β 1 (pg/ml) para concentraciones celulares inferiores y un ligero descenso o desestabilización para concentraciones celulares superiores debido al mecanismo de autorregulación negativa del TGF- β 1.

Figura 36: Secreción de TGF- β 1 (pg/ml) obtenida de las células prediferenciadas a lo largo del tiempo en cultivo. Se sembraron 2×10^6 células sobre una superficie de 6 cm^2 , se analiza la secreción a diferentes tiempos en cultivo, observándose un comportamiento típico de mecanismos de autorregulación, que consiste en un aumento de la síntesis y secreción del mecanismo seguido de un descenso de la secreción hasta que se inicia un nuevo aumento en la secreción.

Figura 37: Secreción de TGF- β 1 (pg/ml), obtenida de diferentes concentraciones de células prediferenciadas creciendo sobre el biomaterial durante 7 días en cultivo. A partir de esta gráfica se puede observar como la presencia del factor en el medio se correlaciona con el incremento del número de células en el biomaterial.

Figura 38: Secreción de TGF- β 1 (pg/ml) obtenida de las células prediferenciadas creciendo sobre el biomaterial a lo largo del tiempo en cultivo. Se sembraron 2×10^6 células sobre los biomateriales, se analiza la secreción a diferentes tiempos en cultivo. De la gráfica se desprende como hay un aumento de la secreción desde el día 1 hasta el día 10 de cultivo, momento a partir del cual empieza a estabilizarse y descender moderadamente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar pero no limitan la presente invención.

Ejemplo 1: Método de síntesis de las matrices de la invención

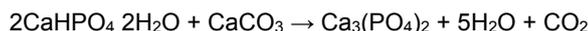
Para llevar a cabo la síntesis de las matrices de la invención se procedió a mezclar con agua bidestilada (fase líquida) una fase sólida.

La fase sólida comprende pero no se limita a un fosfato cálcico ácido, un fosfato cálcico básico, un agente porógeno como carbonato cálcico y un retardante del fraguado como el pirofosfato sódico.

1.1. Preparación de la fase sólida

La fase sólida del cemento cálcico consta de un fosfato cálcico básico y fosfato cálcico ácido. El fosfato cálcico básico es fosfato tricálcico-beta (β -TCP) y el fosfato cálcico ácido es monofosfato cálcico. Se mezclan los dos componentes en una relación molar de 1,785 en mortero con mano durante 10 minutos. Se añade el carbonato cálcico en concentraciones entre 1-20 % (peso/peso) preferiblemente entre 3-10 %. Se emplea el pirofosfato sódico 0,54 % (peso/peso) como retardante de la reacción de fraguado.

En concreto, para la preparación de fosfato tricálcico-beta (β -TCP) se mezclan 34,42 g de DCPD y 10,01 g CC (en relación molar 2:1) en un mortero de cristal y se homogeniza con mano durante 15 minutos. Se calienta la mezcla en horno (Veckstar) a 900 °C durante 14 horas. La síntesis del β -TCP ocurre según la reacción:



A continuación, se tamiza el polvo y se utiliza el polvo que tiene tamaño de partícula menor de 322 μm .

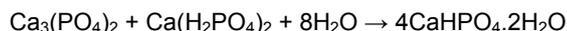
1.2. Preparación de la fase líquida y síntesis de esponjas de monetita

La fase líquida está constituida por agua destilada o bidestilada.

Se pesa la fase sólida formado por 0,8 g de monofosfato cálcico anhidro, 1,4 g de fosfato tricálcico beta, 12 mg de pirofosfato sódico y 110 mg de carbonato y se mezcla 0,77 ml de la fase líquida en una relación polvo líquido (P/L) de 3 en una placa de vidrio durante 30 s.

1.3. Proceso de fraguado

Se fragua el cemento durante 30 minutos en baño de agua a 37 °C. La reacción de fraguado se produce según la reacción:



Durante la reacción de fraguado el bicarbonato reacciona con los hidrogeniones del medio descomponiéndose en dióxido de carbono formando unos huecos y generando así una matriz esponjosa de brushita.

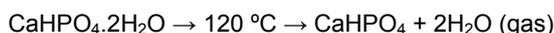
1.4. Proceso de lavado

A continuación, el biomaterial se lava varias veces en agua destilada para eliminar restos de ácidos en el medio hasta llegar a un pH cercano a 7, lo cual resulta óptimo para el crecimiento celular que se llevara a cabo en etapas posteriores.

1.5. Proceso de transformación de brushita a monetita

Una vez se obtiene el material fraguado mediante el proceso descrito en anteriormente, se procede a la esterilización del mismo. El proceso empleado para dicha esterilización comprende autoclavar el material fraguado en un rango de temperatura 120-130 °C durante 24-25 minutos. Durante este proceso la brushita se transforma en monetita.

Proceso de transformación de brushita a monetita:



1.6. Método de síntesis de la matriz de monetita porosa amorfa

Una vez hecha la mezcla de los compuestos, tal y como se describe anteriormente (ejemplo 1.1 a 1.2), el cemento resultante, brushita, se dispone sobre una superficie con forma de interés para su fraguado y su posterior esterilización, obteniéndose así, una matriz amorfa, con escasa presencia de macroporos y distribución irregular de los mismos, tal y como se puede observar en las figuras 6 a y b.

1.7. Método de síntesis de la matriz de monetita de porosidad estructurada

Tras la obtención del cemento mediante el proceso descrito en los ejemplo 1.1 a 1.2, un minuto después de iniciar el fraguado se aplicó al cemento durante 30 segundos el molde de silicona que se muestra en la figura 2. Una vez el material ha fraguado se procede a su esterilización tal y como se describe anteriormente (ejemplo 1.5).

El empleo de diferentes moldes permite obtener materiales que presentan poros cilíndricos con un tamaño medio de $500 \pm 60 \mu\text{m}$ y que permiten conectar los micro y macroporos generados por el porógeno.

La figura 3 muestra un ejemplo de matriz de porosidad estructurada de monetita producida mediante el proceso descrito en la invención. Como resultado de la generación de dióxido de carbono durante la reacción de fraguado así como la aplicación del molde descrito anteriormente, el material resultante muestra un aspecto esponjoso con una distribución de poros dada. Obteniendo de esta forma un biomaterial estéril de monetita, con porosidad estructurada que puede ser utilizado sin más tratamientos como matriz para crecimiento celular.

La figura 5 muestra el diagrama de difracción de las muestras antes y después del tratamiento térmico en el autoclave. Se puede observar en la figura 4 que el tratamiento térmico además de esterilizar el material provoca la transformación cristalina de la estructura de brushita a monetita.

Ejemplo 2: Realización concreta de pastillas de monetita concretas con porosidad estructurada

A modo de ejemplo y con el fin de obtener cementos con características óptimas el componente en polvo formado por 0,8 g de monofosfato cálcico anhidro, 1,4 g de fosfato tricálcico beta, 12 mg de pirofosfato sódico y 110 mg de carbonato cálcico se mezcló durante 30 segundos con 0,77 ml de agua. Un minuto después de iniciar el fraguado se aplicó al cemento durante 30 segundos los moldes que se describen a continuación.

2.1. Utilización de un solo molde en el proceso de obtención de matrices cilíndricas de monetita de porosidad estructurada

Para la realización concreta de este ejemplo se emplearon moldes de silicona con las siguientes dimensiones y número de punzones:

- a) 1 cm de diámetro, 5 mm o 3 mm de altura y 64 punzones
- b) 0,8 cm de diámetro, 5 mm o 3 mm de altura y 39 punzones
- c) 0,7 cm de diámetro, 5 mm o 3 mm de altura y 28 punzones
- d) 0,5 cm de diámetro 3 mm de altura y 12 punzones

En todos los moldes, los punzones son cilíndricos, con un diámetro comprendido entre $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, y distribuidos respetando un perímetro de 0,5 mm (tomado desde el borde hacia el interior del molde) sin punzones. La estructura de dichos punzones es la de los representados en la figura 2.

Durante la reacción de fraguado, tal y como se describe en el ejemplo 1.7, el bicarbonato reacciona con los hidrogeniones del medio descomponiéndose en dióxido de carbono formando unos huecos y generando así una matriz esponjosa de brushita.

A continuación, el biomaterial se lava varias veces en agua destilada para eliminar restos de ácidos en el medio hasta llegar a un pH cercano a 7, que es el óptimo para el crecimiento celular.

Posteriormente, el material se esteriliza. En el proceso de esterilización en autoclave a 130 °C durante 24 minutos la brushita se transforma en monetita obteniéndose así un biomaterial estéril de monetita que puede ser utilizado sin más tratamientos como matriz para crecimiento celular.

Así, el material resultante consiste en las pastillas cilíndricas esponjosas especificadas, constituidas por la biomatriz de porosidad estructurada de la invención, de las dimensiones indicadas en cada caso, con macroporos distribuidos de forma homogénea en dichas pastillas.

El empleo de cada uno de los moldes indicados permitió obtener las siguientes matrices con poros cilíndricos

homogéneamente distribuidos, con un tamaño medio de poro de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, que permiten conectar los micro y macroporos generados por el porógeno:

- 5 a) pastillas cilíndricas de 1 cm de diámetro, 0,5 cm o 0,3 cm de altura y con 64 macroporos (figura 4b)
- b) pastillas cilíndricas de 0,8 cm de diámetro, 0,5 cm o 0,3 cm de altura y con 39 macroporos (figura 4c)
- c) pastillas cilíndricas de 0,7 cm de diámetro, 0,5 cm o 0,3 cm de altura y con 28 macroporos (figura 4d)
- d) pastillas cilíndricas de 0,5 cm de diámetro, 0,3 cm de altura y con 12 macroporos (figura 4a)

10 Tal y como se muestra en la figura 4, estas pastillas de monetita de la invención obtenidas, presentan un perímetro de 0,5 mm (tomado desde el borde de la pastilla hacia el interior de la misma) sin macroporos, permitiéndoles mantener las condiciones de estabilidad mecánica y fortaleza necesarias para ser empleadas en sus aplicaciones.

2.2. Utilización de dos moldes en el proceso de obtención de matrices cilíndricas de monetita de porosidad estructurada

15 Para la realización concreta de este ejemplo, se emplearon dos tipos de molde, uno de silicona (figura 1b) y otro de metal (figura 1c).

20 El molde de silicona se utiliza para la obtención de los cilindros de monetita de tamaño adecuado (sin intervenir en esta fase en la formación de la macroporosidad).

Para la síntesis del molde de silicona, en primer lugar se dispusieron fijadas en una placa de cristal, unas piezas cilíndricas con el mismo tamaño que las piezas de monetita que se deseaba obtener (figura 1a).

25 A continuación, se añadió silicona líquida sobre la placa de cristal con las piezas metálicas, y se esperó a que polimerizara. Una vez polimerizado, se sacó de la placa de cristal. Los moldes de silicona obtenidos, presentan huecos cilíndricos del tamaño de las unidades de monetita que se desea fabricar (figura 1b). Dichos moldes de silicona con los huecos del tamaño de las piezas que se van a fabricar no presentan punzones y, por lo tanto, no contemplan todavía la formación de los macroporos.

30 Se obtuvieron 7 moldes de silicona diferentes, que presentaban huecos cilíndricos de las siguientes dimensiones:

- diámetro 10 mm y altura 5 mm o 3 mm,
- diámetro 8 mm y altura 5 mm o 3 mm,
- 35 - diámetro 7 mm y altura 3 o 5 mm,
- diámetro 5 mm y altura 3 mm.

40 Por otro lado, se fabricaron moldes metálicos con la dimensión de cada pieza de monetita obtenida con cada uno de los moldes de silicona indicados. Dichos moldes metálicos constan de dos partes, una primera que presenta los punzones que dan lugar al componente macroporoso reproducible y una tapa (figura 1c). En concreto, las dimensiones de los moldes metálicos fabricados fue la siguiente:

- a) 1 cm de diámetro, 0,5 cm o 0,3 cm de altura y 64 punzones
- b) 0,8 cm de diámetro, 0,5 cm o 0,3 cm de altura y 39 punzones
- 45 c) 0,7 cm de diámetro, 0,5 cm o 0,3 cm de altura y 28 punzones
- d) 0,5 cm de diámetro, 0,3 cm de altura y 12 punzones

50 En todos los moldes, los punzones son cilíndricos, con un diámetro comprendido entre $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, separados $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, y distribuidos respetando un perímetro de 0,5 mm (tomado desde el borde hacia el interior del molde) sin punzones.

Una vez fabricados los moldes, la creación de las piezas de monetita siguió el siguiente proceso:

- 55 - En primer lugar se rellenaron los moldes de silicona con el producto inmediatamente resultante de realizar la mezcla de la fase sólida y la fase líquida.
- En segundo lugar, antes de que el biomaterial finalice su fraguado, se retiraron las piezas del molde de silicona. El proceso es sencillo ya que el molde es como una goma muy flexible.
- En tercer lugar se introdujeron las piezas en el molde metálico con los punzones, y se taparon. Dicho molde es introducido en un baño de agua a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos hasta que finaliza el fraguado.
- 60 - Un vez que solidificaron totalmente, se retiraron del molde metálico obteniendo piezas cilíndricas con la porosidad deseada.

Las matrices formadas se someten a autoclavado entre 120 y 130 $^\circ\text{C}$ durante 24-25 minutos, produciéndose su conversión a monetita, completamente esterilizada y apta para su uso.

Las piezas obtenidas presentaron la misma porosidad y dimensiones que las piezas obtenidas en el ejemplo 1a (figura 4).

5 **Ejemplo 3: Estudios comparativos entre las matrices de monetita de porosidad estructurada y monetita amorfa**

3.1. Estudio microscópico

10 A continuación, se llevo a cabo un ensayo comparativo de estructura microscópica de las matrices amorfas y de las de porosidad estructurada de la invención. Para llevar a cabo dicho ensayo se emplearon técnicas de microscopía electrónica de barrido mediante procedimientos conocidos para un experto en la materia.

15 Estructura microscópica de la matriz de monetita porosa amorfa

El biomaterial dispuesto en forma de matriz amorfa (figuras 6 a, b), obtiene una porosidad no controlada. Es decir, muestran una distribución de macroporos irregular, producida durante el proceso de obtención del cemento, descrito en los ejemplos 1.1 a 1-6. Los macroporos de la matriz amorfa son huecos en el biomaterial y no conectan la estructura interna (figura 7).

20 En cuanto al número y distribución de macroporos, se observa la escasez de los mismos. La presencia de macroporos es mínima y están dispuestos de forma aleatoria (figura 7).

25 Así, estas estructuras no favorecerán una correcta regeneración ósea al no proporcionar las condiciones necesarias para la correcta colonización y proliferación celular.

Estructura microscópica de la matriz de monetita porosa estructurada

30 Las figuras 6c y 8, por lo contrario, muestra una matriz de monetita con macroporos estructurados. En la imagen de microscopía de barrido (figura 8) se puede apreciar la distribución homogénea de los macroporos.

Al contrario que la estructura anterior, la matriz de monetita de porosidad estructurada favorecerá una correcta regeneración ósea al proporcionar las condiciones adecuadas para la correcta colonización y proliferación celular.

35 3.2. Estudio comparativo *in vivo*

Uno de los aspectos más relevantes a la hora de diseñar un biomaterial para promover la regeneración ósea es desarrollar una estructura que cuente con una porosidad adecuada para la colonización celular y la difusión de gases y nutrientes. De forma particular, los macroporos (de 100 a 500 μm) permiten un medio óptimo para la colonización integral de las células aportadas en la matriz, así como la neovascularización y migración de osteoblastos y osteoclastos de la zona del implante y la formación de nuevo hueso de forma homogénea en toda la estructura proporcionada.

45 El biomaterial de porosidad estructurada desarrollado en la presente invención cuenta con una estructura macroporosa característica, que va a permitir una completa y homogénea distribución de las células osteogénicas proporcionadas en la matriz y además la entrada de células del tejido receptor, que van a colonizar e integrar la nueva estructura, para iniciar su proceso de reabsorción así como formar nueva matriz ósea que se irá depositando sobre el implante para dar lugar a nuevo hueso, con unas características mecánicas y fisiológicas muy similares al tejido original.

50 Para determinar la ventaja que constituye el diseño desarrollado en este trabajo, con respecto a una porosidad no estructurada en macroporos, se realizó un estudio comparativo de la capacidad de regeneración ósea entre biomateriales de monetita sin estructuración de macroporos y con estructuración de la macroporosidad.

55 Para ello, se utilizaron ovejas a las que se realizó un defecto crítico en la tibia y una estabilización por técnicas de osteosíntesis. En el defecto creado, se aplicó en 3 de ellas el biomaterial de monetita no estructurado y en otras 3 el estructurado, dejando en todas ellas la pata adyacente como control (con formación del defecto crítico y estabilización de la fractura pero sin relleno de biomaterial). Previamente a la implantación de los biomateriales, estos fueron sembrados con un número igual de células madre mesenquimatosas del tejido adiposo obtenido de las ovejas.

60 Para determinar la formación de nuevo hueso, se realizó un control radiográfico continuo y un estudio histológico a los 3 y 6 meses de la implantación. Los resultados muestran una clara ventaja del biomaterial con macroporosidad, con respecto al que no lo tiene. A partir de los 3 meses de la implantación se puede observar una mayor

colonización de los osteoblastos y osteoclastos del hueso en toda la estructura del biomaterial macroporoso, y la formación de nuevo hueso de forma homogénea. A los 6 meses, se observa una total integración del material macroporoso con el diseño de la invención, con formación de una nueva vascularización, que va a permitir la generación de un hueso estable, con difusión de nutrientes y oxígeno en toda su integridad y sin formación de zonas necróticas. Sin embargo, cuando el biomaterial no presenta una estructuración de macroporos, se observa la formación de nuevo tejido óseo restringida a la zona periférica al implante, quedando el resto de la matriz sin colonización celular, ni por parte de las células previamente sembradas, ni por las del tejido receptor, y además no se induce la formación de una nueva vascularización.

5

10 Estos resultados permiten concluir que la monetita macroporosa presenta evidentes ventajas con respecto a la formación de hueso nuevo, debido a la colonización de toda la estructura de la matriz por parte de las células de la zona de implantación, para dar lugar a una reabsorción, formación de matriz ósea e inducción de una nueva vascularización de manera homogénea.

15 **Ejemplo 4: Estudios *in vitro* de biocompatibilidad**

Antes de combinar el material de monetita de porosidad estructurada de la invención con células, es necesario demostrar que dicho material es biocompatible.

20 Los ensayos *in vitro* realizados se refirieron a citotoxicidad, genotoxicidad (mutagenicidad) y hemocompatibilidad, teniendo en cuenta que el biomaterial de monetita de porosidad estructurada de la invención puede ser considerado como un producto implantable que va a estar en contacto permanente con el hueso, siendo la duración del contacto superior a 30 días.

25 4.1. Citotoxicidad

Utilizando técnicas de cultivo celular, estos ensayos determinan la lisis celular (muerte de las células), la inhibición del crecimiento celular y otros efectos sobre las células causados por los productos sanitarios, los materiales y/o sus extractos.

30 Mediante este ensayo se determina si el material en estudio, monetita de porosidad estructurada, es tóxico para las células, afecta a su proliferación y viabilidad.

35 El material analizado fue la matriz de monetita de porosidad estructurada obtenido en el ejemplo 1, de dimensiones 1cm de diámetro, 5 mm de altura y 64 macroporos, empleando como control Positivo: PVC, y como Control Negativo: polietileno de alta densidad.

40 En cuanto a las condiciones de extracción, al ser el espesor de los materiales >0.5 mm, 3 cm² del material tienen se pusieron en contacto con 1 ml del medio de cultivo que actúa como agente extractor.

La línea celular empleada, para testar la citotoxicidad del material, fue la línea fibroblástica de ratón L929 cultivada en medio de cultivo DMEM con el 10 % de suero fetal bovino.

45 Se determinó la citotoxicidad y proliferación de la monetita de porosidad estructurada mediante el ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT por el enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado (formazán) y determina la funcionalidad mitocondrial de las células que han estado en contacto con la monetita de la invención, en función de controles positivos y negativos establecidos. De esta manera, la cantidad de células vivas en el cultivo es proporcional a la cantidad de formazán producido y por lo tanto a la cantidad de absorbancia registrada mediante un espectrofotómetro.

50 Como control positivo se utilizó un biomaterial estándar citotóxico comercial, y como controles negativos se utilizaron el vicryl y polietileno de alta densidad, también comerciales. La representación gráfica de las curvas de proliferación obtenidas para las células L929 en cada uno de los casos se observa en la figura 9.

55 Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre la proliferación de las células L929 en monetita estructurada de la invención y en el control negativo, demostrando que la matriz de monetita de porosidad estructurada de la invención no es un biomaterial citotóxico.

60 4.2. Mutagenicidad

En los ensayos de genotoxicidad, se utilizan cultivos celulares de mamíferos o no mamíferos u otras técnicas, para determinar las mutaciones genéticas, los cambios en la estructura o en el número de cromosomas y otras alteraciones del ADN o de los genes causadas por la toxicidad de los productos sanitarios los materiales y/o sus extractos.

Se determinó el potencial mutagénico *in vitro* de la monetita de porosidad estructurada de la invención mediante el ensayo denominado "Mouse Lymphoma Assay". Dicho ensayo está basado en la cuantificación de mutaciones en el gen timidina kinasa en las células de linfoma de ratón L5178TK+/-, inducidas o no tras el tratamiento de estas células con el biomaterial monetita de porosidad estructurada. Las células deficientes en el gen Timidina Kinasa (TK) a causa de la mutación TK-/- son resistentes a los efectos citotóxicos de la trifluorotimidina (TFT). Las células capaces de producir TK son sensibles a la TFT, que inhibe el metabolismo y detiene la división celular. Así pues, las células mutantes son capaces de proliferar en presencia de TFT, mientras que las células normales que contienen al menos un alelo del gen TK no lo son. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos y el resultado final se obtuvo tras contar visualmente los pocillos positivos (figuras 10 a y b), en donde se observa el crecimiento de una colonia de células) y los negativos (figuras 10 c y d, donde no se observa crecimiento alguno). Una vez contados los pocillos positivos y negativos de cada placa de 96, se aplican una serie de fórmulas establecidas para el ensayo y los resultados se expresan en términos de frecuencias de mutación.

Para llevar a cabo el ensayo, las células se expusieron al producto a testar en presencia y ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica, dado que en ocasiones puede ocurrir que un producto a testar no sea mutagénico, pero que sí lo sean los metabolitos generados *in vivo* a partir de ese producto.

El sistema más comúnmente empleado para simular *in vitro* el metabolismo hepático es una fracción postmitocondrial denominada S9 a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de rata tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254. De esta manera, previamente al tratamiento celular, el producto a testar se trata durante 2 h con la mezcla denominada S9, y transcurrido ese tiempo se tratan las células con el sobrenadante obtenido de esta mezcla tras la centrifugación de la misma.

Para el tratamiento de las células se utilizaron los siguientes productos:

- Como controles positivos:

- Metilmetanosulfonato (MMS) en ausencia de activación metabólica.
- 3-Metilclorantreno (3-MCA) en presencia de activación metabólica.

- Como controles negativos:

- Medio de células L5178YTK+/- incubado durante 24 h.
- Medio de células L5178YTK+/- en presencia de activación metabólica incubado durante 24 h.

- Como producto a testar:

- Medio de células L5178YTK+/- incubado durante 24 h con el biomaterial monetita.
- Medio de células L5178YTK+/- incubado durante 24 h con el biomaterial monetita en presencia de activación metabólica.

Los resultados obtenidos (representados en la figura 11) muestran que tanto en presencia como en ausencia de activación metabólica se observa que los controles negativos utilizados en el experimento inducen una frecuencia de mutación baja y parecida a la que presentan las células que se han cultivado en presencia de la monetita de porosidad estructurada. La existencia de células mutadas cultivadas con su medio de cultivo se debe a la alta tasa espontánea de mutación que poseen estas células, de esta manera, esta frecuencia de mutación se establece como background. En cuanto a los controles positivos, la frecuencia de mutación inducida en las células L5178YTK+/- es claramente superior (unas 7 veces más en ambos casos) al que inducen la monetita o el medio de cultivo. Estos resultados demuestran que la monetita no es un biomaterial mutagénico.

4.3. Hemocompatibilidad

Estos ensayos evalúan los efectos producidos en la sangre o sus componentes por productos sanitarios o materiales que entran en contacto con la sangre, utilizando un modelo o sistema apropiado. Los ensayos de hemólisis determinan el grado de lisis de los hematíes y la liberación de hemoglobina causadas por los productos sanitarios, materiales y/o sus extrastos *in vitro*.

Se determinó la hemocompatibilidad de la monetita de porosidad estructurada de la invención mediante un ensayo colorimétrico de determinación de hemoglobina en sangre total y de hemoglobina liberada al plasma cuando la sangre se expone a la monetita. Dado que el biomaterial se encuentra en fase sólida, se testaron medios de cultivo de células (osteoblastos y AMSC) que estuvieron en contacto durante 24 horas con la monetita. Los resultados muestran que el coeficiente de variación de las rectas de calibración, muestras y controles de calidad (% CV)

es $\leq 20\%$ en todos los casos (excepto en el caso del calibrador 6) y 2/3 de los valores de la recta de control de calidad presentan un porcentaje de diferencia frente al teórico ($\% \text{PVDF}$) $\leq 20\%$, por lo que los resultados del ensayo se encuentran dentro de los criterios de aceptación establecidos.

- 5 Los porcentajes de hemolisis de los compuestos utilizados fueron los siguientes, considerando como 100 % de hemolisis el valor de concentración de hemoglobina de 10,19 mg/ml que presenta la sangre utilizada:

Compuesto	Porcentaje de Hemolisis
Control positivo: Tritón X-100 1 %	94
Control negativo: Polietilenglicol 40 %	1,27
Medio de hueso	0
Medio AMSC	0
Medio de hueso + monetita estructurada	0
Medio de AMSC + monetita estructurada	0

- 10 Estos resultados, representados en la figura 12 permiten concluir que la monetita de porosidad estructurada de la invención, es un biomaterial hemocompatible.

Ejemplo 5: Estudio comparativo de bioactividad entre la matriz de monetita porosa amorfa y la matriz de monetita de porosidad estructurada

- 15 La bioactividad de un material va a depender tanto de su composición químico-física como de su estructura.

Así, en el presente ejemplo se lleva a un estudio para determinar el efecto que tiene el empleo de la matriz amorfa o de la matriz de porosidad estructurada indicadas sobre la capacidad de proliferación de células madre mesenquimatosas, una de las estirpes celulares implicadas en el proceso de regeneración ósea junto con los osteoblastos del tejido receptor.

25 Una vez obtenida la biomatriz porosa, tal y como se ha descrito anteriormente, se procedió a su lavado con medio de cultivo de pH 7,4 durante una o dos horas para hidratar y neutralizar el pH (cambiando el medio de cultivo 2 o 3 veces). Posteriormente, células madre mesenquimatosas adultas de tejido adiposo (ATMC) fueron sembradas directamente sobre el material, a una concentración de $0,5 \cdot 10^6$ - $6 \cdot 10^6$ células por cm^2 . Trascorridas dos horas de la siembra, se adicionó medio de cultivo hasta cubrir todo el material, renovándolo cada dos o tres días.

30 Las células se cultivaron en el biomaterial durante 7 días, tras lo cual, se procedió a analizar la biomatriz en cuya superficie se habían adherido las células por microscopía electrónica de barrido (SEM), para observar la capacidad de adhesión y colonización de dichas células sobre el biomaterial de monetita porosa.

35 Las imágenes obtenidas por SEM (ver figura 13 a y b), demuestran que las células madre mesenquimatosas son capaces de adherirse perfectamente al biomaterial, adoptando una morfología adecuada y que además establecen contactos intercelulares, como ocurre en un tejido a nivel fisiológico (figura 13 c y d). Como puede observarse en las figuras 13 c y d las células se expanden perfectamente con el biomaterial, interaccionando de forma máxima con el mismo y emitiendo prolongaciones citoplasmáticas (filipodios), que aumentan la superficie de contacto e incrementan el nivel de contacto intercelular.

40 El biomaterial de porosidad estructurada proporciona una mayor superficie en la que las células se pueden adherir, proliferar e iniciar a realizar sus funciones en el proceso de regeneración ósea. Es decir, pueden iniciar la creación de nueva matriz ósea que va a sustituir al biomaterial y expresar moléculas de señalización que potenciarán y dirigirán el remodelado óseo y la neovascularización.

45 Por el contrario, el empleo de la matriz amorfa como soporte para el crecimiento celular, muestra que la distribución aleatoria de poros no es adecuada para que se pueda dar lugar a una colonización eficiente de las células (figura 14 a y b), quedando estas relegadas en su mayoría a la superficie de la matriz puesto que tienen un tamaño significativamente mayor que la microporosidad que caracteriza al biomaterial.

50 Los resultados, tal y como se muestran en la figura 15, demuestran que en la matriz de monetita de porosidad estructurada se cuantifican un mayor número de células. A las 24 de cultivo las células en la matriz de monetita de porosidad estructura proliferan 1.5 veces más con respecto a las que se encuentran en la matriz de monetita amorfa, llegando a ser la proliferación 1,8 veces superior a las 48 horas de cultivo.

55 En la matriz de la monetita amorfa, las células a lo largo del tiempo dan valores de proliferación inferiores al número de células dispuestas en el tiempo 0 horas. Estas células no tienen sitio para distribuirse y se compactan en los macroporos sin continuidad de la superficie, inhibiendo su proliferación y localizándose solamente en la superficie del material sin posibilidad de colonizar su interior, solamente podrían introducirse en los escasos macroporos

dispuestos de forma aleatoria. Estos macroporos se encuentran a modo de oquedades que, en ningún caso penetran por toda la estructura, lo que dificultaría su interacción con el tejido circundante *in vivo* y la llegada de nutrientes y oxígeno a todas las células. Estas células solo pueden distribuirse por la superficie del biomaterial. Estas células se compactan por falta de espacio, inhibiendo su proliferación y localizándose la mayoría de ellas tan solo en la superficie del material.

Sin embargo, las células dispuestas en la matriz de monetita con porosidad estructurada se distribuyen por todos los poros, en el interior de estos y por la superficie del material dando valores de crecimiento superiores al tiempo 0 horas. Estas células no se compactan al tener mayor superficie de contacto con el material y por tanto no inhiben su crecimiento.

Ejemplo 6: Determinación del número de células a implantar por superficie de matriz

No existen estudios que permitan estandarizar o conocer el número de células óptimo en este tipo de biomateriales, por lo que los distintos investigadores llevan a cabo de forma específica sus adaptaciones para conseguir el máximo resultado clínico.

Para que la regeneración ósea tenga éxito el implante tiene que integrarse en la estructura ósea del organismo. Para ello, las células del paciente, (endoteliales, osteoblastos, osteoclastos, macrófagos, etc) tienen que interactuar con el producto y colonizarlo, junto con las células aportadas. Por otro lado, es necesaria una cantidad de células en el producto suficiente para que se cree un efecto trófico potente, que active la zona y desencadene el proceso regenerativo.

Para que pueda producirse la convivencia entre las células del paciente y las del producto, un potente efecto trófico del producto y una homogénea distribución celular y difusión de nutrientes, gases y productos de desecho del metabolismo, el biomaterial debe aportar un número alto de células, pero sin que dichas células lleguen a obturar la estructura porosa del biomaterial.

Además, el aporte celular debe ser importante puesto que a medida que se vaya degradando el biomaterial, este tiene que ser reemplazado por matriz sintetizada por las propias células.

En conclusión, la cantidad idónea de células es aquella que ocupe prácticamente la totalidad de la superficie del biomaterial pero que no produzca la obturación de la estructura porosa, por los siguientes motivos:

- Conseguir el efecto trófico suficiente para activar el proceso de regeneración ósea.
- Sintetizar suficiente matriz extracelular para reemplazar al biomaterial.
- Permitir la llegada y asentamiento de células del paciente implicadas en la regeneración ósea, entre las que se encuentran las células endoteliales encargadas de la neovascularización.

Para determinar el número de células a implantar por superficie de biomaterial, se realizó la siembra de concentraciones crecientes de células en el biomaterial y se observó al SEM, el grado de colonización de la estructura. Este estudio también permite determinar si la forma de siembra empleada es adecuada para que la distribución de las células sea homogénea.

El procedimiento empleado consistió en sembrar discos de monetita de 1cm de diámetro, 0,5 cm de altura, y 64 macroporos con un diámetro de 500 µm, con concentraciones celulares crecientes que abarcan desde medio millón de células hasta 6 millones por biomaterial ($0,5 \times 10^6$ - 1×10^6 - 2×10^6 - 3×10^6 - 4×10^6 - 5×10^6 - 6×10^6). Las células se mantienen durante 8 días en contacto con el biomaterial, para permitir su adaptación y asentamiento. Los resultados se analizan por SEM.

Las imágenes (Figuras 17 y 18) indican que a medida que aumenta la concentración celular se incrementa el grado de colonización del biomaterial de monetita de porosidad estructurada de la invención, puesto que la capacidad de adhesión al biomaterial es cercano al 100 %. Cuando se aplica la dosis inferior, la superficie del biomaterial no muestra una invasión completa, sino que este fenómeno comienza a visualizarse a partir de las dosis de 2×10^6 y 3×10^6 de células. Sin embargo, los poros de 500 µm comienzan a obturarse a partir de la siembra de 4×10^6 células y a las dosis de 5×10^6 y 6×10^6 se encuentran totalmente obturados. Además, a partir de la dosis de 1×10^6 células ya se observa ocupación del interior de los poros del biomaterial, aumentando dicha ocupación con la dosis celular.

Según los resultados obtenidos, para los biomateriales utilizados que tienen una superficie de contacto total de aproximadamente 6 cm², una buena cantidad de células estaría comprendida entre 2 y 3 millones de células, lo que resulta entre 300.000 y 500.000 células por cm².

Ejemplo 7: Análisis de la evolución de las células en la matriz. Análisis del estado celular en la matriz a diferentes tiempos

Una vez seleccionado el rango de dosis celular adecuado para su disposición en el biomaterial, a continuación se estudió la evolución de las células en el biomaterial de porosidad estructurada a lo largo del tiempo. Para ello, se llevó a cabo un análisis del comportamiento celular *in vitro* a distintos tiempos.

5 7.1. Observación de las células prediferenciadas en la matriz de porosidad estructurada a lo largo del tiempo:

Para poder observar de forma adecuada a las células en el biomaterial de porosidad estructurada, se realizó una observación directa por microscopía electrónica de barrido (SEM) y además una visualización de las células con tinción nuclear de Hoechts por microscopía confocal. La visualización por SEM proporciona datos sobre la afinidad y capacidad de interacción de las células con el biomaterial, a través de la observación de la superficie de contacto. Sin embargo, es posible que el procesado de las muestras para SEM elimine células del biomaterial, que pueden ser visualizadas mediante técnicas fluorescentes.

El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- Siembra de 300.000 AMSC prediferenciadas por cm² de biomaterial.
- Realización del procesado para SEM o la tinción nuclear de Hoechts y visualización por microscopía confocal.
- Análisis de la distribución y grado de interacción de las células en el biomaterial transcurridos 1, 4, 7, 10 y 15 días de asociación.

Las imágenes de los resultados de observación por microscopía confocal muestran de forma muy específica y con un mínimo ruido de fondo los núcleos celulares teñidos con Hoechts. Se obtuvieron imágenes de las células en la superficie de biomaterial (TOPVIEW) y en el interior de los canales de los macroporos (SIDEVIEW), previa fractura controlada del biomaterial.

En la imagen TOPVIEW (Figura 19a), se observa que a medida que transcurre el tiempo de cultivo se da un aumento en el número de células en la superficie del biomaterial, que van cubriendo las paredes de los macroporos y obturando la superficie de todos a partir de los 10 días de cultivo.

La imagen SIDEVIEW (Figura 19b) es un montaje de varias imágenes seriadas para poder observar las células en toda la longitud del macroporo. Las células colonizan el interior de los canales desde el día 1 de asociación. A medida que transcurre el tiempo, se observan un mayor tapizado celular y grandes agregados a los 10 y 15 días de cultivo.

Las imágenes de los resultados de observación por SEM muestran también imágenes de la superficie del biomaterial (TOPVIEW) y del interior del poro en su totalidad (SIDEVIEW).

En las imágenes TOPVIEW (Figura 20), se observa el aumento del grado de colonización a medida que transcurre el tiempo de cultivo. Se observa una obturación de los poros a partir del 7º día de cultivo, llegándose a obturar prácticamente la totalidad de los poros a los 15 días.

En las imágenes SIDEVIEW (Figura 21), observamos un menor número de células, incluso en los tiempos largos, debido a pérdidas producidas en el procesamiento de las muestras. Sin embargo, nos ofrece un análisis claro de la naturaleza de la interacción de las células con el biomaterial utilizando criterios morfológicos. Las células muestran una gran superficie en contacto con el biomaterial observando un gran número de extensiones citoplasmáticas, y además son capaces incluso de introducirse en su estructura interna.

Una vez analizadas las imágenes de Hoesch y SEM, se puede concluir que, en torno a los 4 días, las AMSC interaccionan de forma adecuada y homogénea con el biomaterial de monetita de porosidad estructurada de la invención, se invade la mayoría de su superficie, sin producirse la obturación de poros, lo que permitirá el paso de nutrientes y de células hospedadoras que acudirán a la llamada trófica de las AMSC.

7.2. Determinación del efecto osteoinductor del material de monetita de porosidad estructurada

55 Análisis de expresión génica de células mesenquimatosas adultas obtenidas del tejido adiposo (ATMC) sin diferenciar, por comparación de la estructura de matriz de monetita con porosidad estructurada frente a monetita amorfa

El biomaterial de monetita de porosidad estructurada tiene una distribución macroporosa que favorece la distribución homogénea de las células por toda la matriz. Además esta disposición porosa permite mejor la llegada de nutrientes, gases y las moléculas de señalización producidas por las mismas células. Todo ello determina que las células se encuentren en mejores condiciones y que puedan comunicarse de forma más efectiva para expresar su fenotipo osteogénico. Por este motivo, es posible que la nueva estructura del biomaterial potencie el efecto osteoinductivo de la naturaleza de la matriz (derivado del fosfato cálcico, al igual que el hueso), e induzca la expresión de genes

relacionados con la diferenciación osteogénica.

Para determinar este efecto inductor de la osteogénesis debido a la nueva estructura macroporosa, se realizan análisis de la expresión de genes relacionados con la diferenciación ósea, mediante RT-PCR, comparando la estructura de la matriz de monetita amorfa con respecto a la porosa estructurada.

Para ello se va lleva a cabo el siguiente experimento:

1.- Disposición de células madre mesenquimatosas adultas obtenidas del tejido adiposo y osteoblastos de hueso humano, sobre las matrices porosas de monetita amorfa y de monetita con porosidad estructurada, a una concentración de 10^6 células/cm³.

2.- Mantenimiento en cultivo durante 7 días sobre los biomateriales, para permitir que la estructura del biomaterial actúe sobre el comportamiento celular.

3.- Extracción del RNA de las células que se encuentran sobre los biomateriales y análisis de la expresión de los siguientes genes mediante RT-PCR: fosfatasa alcalina, osteopontina, osteonectina y osteocalcina. Estos genes se encuentran directamente relacionados con el proceso de diferenciación ósea y se activan a medida que las células madre mesenquimatosas y los osteoblastos llevan a cabo su proceso diferenciación hacia hueso.

Los resultados indican una inducción de la expresión de genes osteoinductores en las células que se encuentran en el biomaterial de monetita de porosidad estructurada con respecto a la amorfa.

En las células madre mesenquimatosas se produce una inducción en los genes de diferenciación temprana osteopontina y osteonectina y en menor medida de los genes de diferenciación tardía fosfatasa alcalina y osteocalcina, con respecto a las células dispuestas en la monetita amorfa.

Con respecto a los osteoblastos, se observa una inducción de la expresión de genes de diferenciación tardía como la fosfatasa alcalina y la osteoclastina.

Estos resultados demuestran que la estructura del biomaterial tiene una influencia directa en el comportamiento celular. La distribución macroporosa homogénea y con poros capaces de atravesar la estructura en su totalidad, dándose una mayor interconexión porosa, permite una mayor comunicación intercelular y un mejor estado celular por el acceso a los nutrientes y los gases. Esta situación permite expresar de forma más efectiva el fenotipo celular y potencia el efecto osteoinductor producido por la composición del biomaterial.

Este efecto se verá multiplicado cuando el biomaterial sea incorporado al defecto óseo *in vivo*, en donde las señales osteogénicas se multiplicarán en el entorno del defecto óseo, para que pueda darse una reparación tisular. Estas señales reclutarán osteoblastos del hueso y células madre mesenquimatosas de la médula ósea, que podrán invadir el biomaterial de forma homogénea, y producir nueva matriz ósea que irá sustituyendo al biomaterial que se va reabsorbiendo, para producir una reparación estable.

Estudio del mantenimiento del estado de diferenciación de las células dispuestas en el biomaterial de monetita de porosidad estructurada a lo largo del tiempo (comparación del comportamiento de ATMC prediferenciadas y sin diferenciar)

Como se indicaba anteriormente, además de su disposición y distribución, es importante averiguar el estado funcional de las células en el biomaterial de porosidad estructurada a lo largo del tiempo, para determinar el mantenimiento del estado de diferenciación osteogénica, es decir, si se mantiene la orientación hacia la formación de células óseas, capaces de sintetizar matriz extracelular que sustituya el biomaterial que se va degradando, para regenerar el defecto óseo.

En este estudio se analizó el mantenimiento de la expresión de genes implicados en la osteogénesis en AMSC prediferenciadas dispuestas en el biomaterial. Con este objetivo, se analizó la expresión de los siguientes genes implicados en el proceso de osteogénesis mediante RT-PCR: osteopontina (OPN), osteocalcina (OCA), osteonectina (OTN), TGF- β 1, fosfatasa alcalina (FA) y colágeno tipo I (COL-1) (figura 22). El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- Disposición de 300.000 células AMSC sin diferenciar y prediferenciadas por cm² del biomaterial.
- Análisis de la expresión de la fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteopontina, colágeno tipo-1 y el TGF- β 1, a los tiempos de 1, 4, 7, 10 y 15 días en cultivo de asociación con el biomaterial.

En cuanto a los resultados con AMSC sin diferenciar, como se puede observar en la figura 22, las células AMSC expresan todos los genes estudiados, osteonectina, osteocalcina, osteopontina colágeno tipo 1, TGF- β 1 y la enzima fosfatasa alcalina.

5 Esta expresión no se modifica cuando se cultivan sobre el biomaterial de porosidad estructurada en los tiempos analizados. En concreto, osteonectina, osteocalcina, colágeno tipo 1 y TGF-β1 mantienen su expresión a los 4, 7, 10 y 15 días del cultivo sobre el biomaterial. La expresión de osteopontina aparece disminuída a los 4 y 7 días, pero se recupera y mantiene a los 10 y 15 días de cultivo en el biomaterial. Sin embargo, la expresión de la enzima fosfatasa alcalina es muy ligera en las AMSC, se pierde durante el cultivo en el biomaterial e inicia su expresión a partir de los 15 días de cultivo.

10 El colágeno tipo 1, la osteopontina y la osteonectina se expresan de forma temprana en las células osteoprogenitoras. La osteocalcina aparece cuando se inicia la mineralización. En este caso, las AMSC expresan tanto proteínas implicadas en el inicio de la diferenciación osteoblástica como en la fase final de dicha diferenciación. Además, son capaces de sintetizar colágeno, que forma parte del componente orgánico de la matriz del hueso. Estas proteínas una vez sintetizadas pueden ser adsorbidas y quedar atrapadas en la nueva matriz que se forme.

15 La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosforo inorgánico a partir de esteres fosfóricos, necesarios para la mineralización, es decir, participa en la mineralización del hueso y en la maduración de la matriz osteoide y por lo tanto su expresión es muy tardía en el proceso de diferenciación celular.

20 El TGF-β1 es un potente estimulador de la formación ósea, potencia la diferenciación osteoblástica y la síntesis de matriz ósea e inhibe la síntesis de proteasas que degradan la matriz. De hecho, está siendo utilizado como marcador serológico pronóstico de la capacidad de consolidación en el proceso de evolución de la pseudoartrosis.

25 En cuanto a los resultados con AMSC prediferenciadas, cuando las células se prediferencian hacia hueso durante 8 días y se disponen en cultivo sobre la monetita de porosidad estructurada de la invención (figura 23), no se producen variaciones en el perfil de expresión génica.

30 Las células prediferenciadas muestran todavía el mismo patrón de expresión de los genes relacionados con la regeneración ósea que las AMSC sin diferenciar. Cuando las AMSC prediferenciadas se disponen en el biomaterial, se mantiene la expresión de estos genes, no evidenciándose signos de interacción que disminuyan la expresión de genes implicados en la regeneración ósea (Figura 23).

35 La baja expresión de la enzima fosfatasa alcalina puede ser debida a que en las fases iniciales de la formación de la matriz osteoide no interviene este enzima de forma preferente. En el inicio de la formación del hueso en primer lugar se da la síntesis y excreción de proteínas a la matriz, estas forman una estructura ordenada en la que se depositarán las sales de calcio. La fosfatasa alcalina interviene al final del proceso cuando se produce la mineralización. Este enzima genera iones fosfato (que en este caso ya los está proporcionando el biomaterial) y el aumento de la concentración de estos iones en la matriz crea centros de nucleación para el depósito de sales minerales.

40 Así, como conclusión final cabe indicar que el biomaterial de monetita estructurada de la invención, a diferencia del de monetita amorfa, permite una colonización completa tanto de su estructura externa como interna por parte de las células, la llegada de nutrientes y gases a toda su estructura para mantener unos altos perfiles de viabilidad y una inducción de la proliferación, así como una mejor expresión de los genes relacionados con la osteosíntesis y generación de nueva matriz ósea.

45 **Ejemplo 8: Análisis de la secreción de matriz extracelular en el biomaterial de porosidad estructurada por parte de las células a lo largo del tiempo. Potencia**

50 8.1. Estudio de la expresión de las proteínas implicadas en la formación de la matriz extracelular a lo largo del tiempo (OPN, OCA, colágeno tipo 1)

55 El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado que contiene células especializadas, matriz orgánica formada por proteínas y fase mineral compuesta por sales de calcio. La matriz proteica le permite ser flexible y tolerar la tensión, mientras que las sales de calcio le dan firmeza y resistencia a la presión. En el proceso de formación del hueso, primero se sintetizan los componentes de la matriz proteica, conformando una estructura ordenada en la que posteriormente se depositarán las sales de calcio.

60 La matriz proteica representa un tercio del peso óseo. Está formada por proteínas como el colágeno tipo-I (>95 %) y otras que intervienen en la fijación del calcio, como la osteocalcina (OCA-15 %) y osteopontina (OPN). El colágeno-I y OPN se expresan de forma temprana en las células osteoprogenitoras. La OCA aparece cuando se inicia la mineralización y es un marcador útil para estadios finales de diferenciación osteoblástica. Las células prediferenciadas sintetizan en su citoplasma el colágeno tipo 1, osteopontina y osteocalcina como sucede en las células de hueso. También se ha demostrado que las células prediferenciadas expresan los genes de OPN, OCA y colágeno tipo 1 cuando están dispuestas sobre las matrices de monetita de porosidad estructurada de la invención.

Por ello, es importante determinar si estas células, además de expresar sus genes, son capaces de sintetizar estas proteínas y excretarlas para formar la estructura ordenada en la matriz, imprescindible para el depósito de las sales de calcio en la formación del nuevo hueso.

5 El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- Disposición de 300.000 AMSC prediferenciadas por cm^2 del biomaterial.
- Inmunodetección de las proteínas de matriz extra celular ósea OPN, OCA y COL-1 en el biomaterial.
- Análisis mediante microscopía confocal a los tiempos 1, 4, 7, 10 y 15 días de asociación con el biomaterial.

10 Como en ocasiones anteriores, se presentan imágenes TOPVIEW (figuras 25, 27, 29 y 31a) de la superficie del biomaterial, e imágenes SIDEVIEW (figuras 26, 28, 30 y 31b), correspondientes a reconstrucciones cortes longitudinales del interior del poro.

15 La interpretación de las imágenes de inmunomarcaje (Figuras 25 y 26), indican la formación y secreción de colágeno I desde el primer día de asociación, lo que va aumentando a medida que transcurre el tiempo. También se observa un aumento del número de células en el biomaterial desde el día 1 hasta el 15, lo que corrobora la capacidad de colonización del biomaterial de porosidad estructurada por las AMSC, como se ha determinado en experimentos previos.

20 En las imágenes SIDEVIEW (figura 26), no se aprecia marcaje de colágeno a partir del día 7 de asociación, lo que es debido a la obturación que se produce en los poros, como se ha observado en las imágenes de SEM (figuras 17-18 y 20-21), que impide la difusión del anticuerpo al interior del biomaterial. Este fenómeno ocurre en todos los inmunomarcajes realizados, a partir del día 7 de asociación.

25 En cuanto a la osteocalcina, las AMSC prediferenciadas producen y secretan OCA en el biomaterial de forma creciente a medida que avanza el tiempo de asociación. Las imágenes de la zona interna de los poros solo muestran marcaje hasta los 7 días, de nuevo por la obturación de los poros y la dificultad en la difusión del anticuerpo. Sin embargo estas imágenes nos permiten observar una gran colonización de los núcleos a medida que avanza el tiempo de cultivo en el biomaterial, en toda la longitud del poro (Figuras 27 y 28).

30 En el caso de la osteopontina (OPN) (figuras 29 y 30) también se observa una síntesis y excreción de la proteína en el biomaterial, desde el día 1 al 15 de asociación. De nuevo, las imágenes del interior de los poros (figura 30) son más pobres por la dificultad en la difusión del anticuerpo.

35 Para corroborar que la falta de señal en el interior longitudinal de los poros a lo largo del tiempo se debe a la dificultad en la difusión del anticuerpo, se llevó a cabo el inmunomarcaje de las proteínas previa fractura del biomaterial de forma que queda al descubierto la pared del poro interno en su totalidad, de esta forma se tiene acceso directo a toda la superficie interior de los poros (figuras 26, 28, 30 y 31b).

40 Como se puede observar en la figura 31, a los 4 días, tiempo posible de asociación del biomaterial de la invención previo a la realización del implante en el paciente, se observa una marca contundente de todas las proteínas analizadas tanto en la superficie del biomaterial de la invención, como en toda la longitud de la superficie interna de los poros. Estos resultados indican que las MSC prediferenciadas que se encuentran en el biomaterial de porosidad estructurada son capaces de sintetizar y secretar proteínas relacionadas con la síntesis ósea como el colágeno tipo I, osteopontina y osteocalcina.

8.2. Análisis del calcio sintetizado por las células sobre el biomaterial a lo largo del tiempo mediante EDX

50 Se ha comprobado que las AMSC prediferenciadas en el biomaterial, son capaces de iniciar la síntesis de proteínas para formación de nuevo hueso, pero para que se pueda producir una matriz ósea estable es necesario que se produzca, además, un proceso de mineralización.

55 Para determinar este hecho, se analiza si las AMSC son capaces de sintetizar depósitos de calcio para formar la fase mineral del hueso.

60 En el organismo, los osteoblastos participan en la mineralización de la matriz orgánica, produciendo vesículas de matriz de 100 nm rodeadas de membrana, en la que se acumula Ca^{2+} y PO_4^{2-} , ricas en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas capaces de generar iones PO_4^{2-} . El aumento de estos iones hace que se formen centros de nucleación, necesarios para que se depositen las sales minerales.

Una de las proteínas de unión al calcio es la osteocalcina, que según los resultados obtenidos, se encuentra formando parte de la matriz orgánica que sintetizan las células prediferenciadas sobre el biomaterial. La alta expresión de esta proteína, sugiere que las células pueden secretar depósitos de calcio para formar el mineral del

nuevo hueso. Por ello, es interesante estudiar si estas células pueden liberar depósitos de calcio al medio extracelular. Este calcio podría formar parte de la nueva matriz, bien formando cristales de hidroxiapatita o uniéndose a las proteínas y quedando absorbido en la matriz como sucede en el organismo.

5 El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- Disposición de AMSC prediferenciadas sobre el biomaterial a la misma concentración que en las experiencias anteriores.
- Mantenimiento en asociación durante 4, 7, 10, y 15 días.
- 10 - Análisis del calcio mediante SEM asociado a EDX (dispersión de la energía mediante rayos X). Esta técnica permite analizar y discernir los elementos químicos que se encuentran en una muestra.

15 Las imágenes de los resultados obtenidos muestran zonas puntuales en las que se ha analizado la distribución de elementos químicos elementales mediante SEM-EDX (figuras 32 y 33). Esta técnica permite determinar qué elementos y su proporción en una muestra utilizando una alta definición. En este caso permite determinar si las células están produciendo elementos relacionados con la mineralización de la matriz ósea.

20 En primer lugar, se analizaron los elementos que aparecen en el biomaterial solo y se busca una forma de distinguirlos de la matriz ósea producida por las células, ya que los elementos implicados son los mismos (Ca y P).

En el análisis del biomaterial de porosidad estructurada de la invención sin AMSC se distinguen los siguientes elementos:

- 3 picos de calcio que emiten energía en tres líneas α , β y λ , dependiendo de hasta qué nivel energético penetren los electrones incidentes. La línea λ se solapa con la del carbono y es más difícil de discernir.
- 25 - Oxígeno
- Fósforo
- Carbono

30 Análisis de las AMSC en el biomaterial de porosidad estructurada de la invención

35 Para poder determinar los elementos presentes en las células, sin interferencia de los del biomaterial, se han tomado como referencia, puntos en el centro de los canales, alejados de las paredes del biomaterial, por lo que las medidas y los elementos detectados corresponden exclusivamente a las células. Se han realizado medidas a los 4, 7, 10 y 15 días de asociación.

40 Los gráficos de las figuras 32 y 33 indican una distribución de elementos diferente de la encontrada en el biomaterial. Aparece una distribución completamente diferente de elementos, entre los que se encuentra como novedad el silicio, elemento distintivo procedente de las células, que no aparece en ninguna muestra tomada en el biomaterial y un aumento muy significativo del carbono. Es decir, en las células se pueden distinguir:

- Calcio en sus 3 líneas de energía
- Oxígeno
- Fósforo
- 45 - Silicio
- Carbono

50 A los 4 días de asociación, todavía no se observan partículas electrodensas procedentes de las células. La distribución de los elementos nos muestra un patrón diferente al de la monetita, los picos del calcio son muy bajos y aparecen otros picos como el del silicio y otros elementos que forman parte de las células (figuras 32b y c).

55 A los 7 días, se observan en las células partículas más electrodensas, y la distribución de sus elementos es algo diferente. Sobre todo en lo referente a los picos del calcio, los cuales aparecen más intensos en las partículas (figuras 32d y e).

60 A los 10 y 15 días de cultivo se observan las células ocupando completamente el centro del poro y, sobre ellas, claramente partículas electrodensas, con picos muy intensos en calcio y fósforo. Cuando analizamos la composición química de las células, esta proporciona un patrón de líneas de calcio bastante más bajas que cuando analizamos la composición de las partículas electrodensas, tanto a los 10 como a los 15 días del cultivo (figuras 33 a-b y c-d).

Según los resultados obtenidos a lo largo del tiempo de asociación, aparecen partículas electrodensas de forma creciente cuya composición química principal es fósforo y calcio (figura 34).

Estas partículas electrodensas de calcio y fósforo son sintetizadas y excretadas por las células, ya que aparecen

asociadas al silicio (exclusivo de las células) y los puntos de medida se han tomado en una zona sin biomaterial. Estas partículas pueden ser vesículas de matriz que se encuentran en el organismo, en las que se acumulan Ca^{2+} y PO_4^{2-} . Estos elementos son los que inician la formación de la nueva matriz ósea mineralizada.

5 El hecho de que aparezca silicio formado por las células es muy relevante como indicador de formación de nueva matriz y de la capacidad de regeneración ósea. En el organismo, el silicio se concentra en los osteoblastos e interviene en la producción de la matriz y en el depósito de las sales minerales.

10 Ciertos estudios llevados a cabo por Schwarz y Carlisle demuestran un papel importante del silicio en la osteogénesis. Según estos autores, el silicio se presenta en tasas elevadas en sitios de calcificación. Demuestran que en lugares en los que se produce un proceso intenso de calcificación, como es el caso de las fracturas, se encuentran importantes concentraciones de silicio.

15 El silicio actúa como elemento que permite enlaces longitudinales entre las proteínas y los polisacáridos o bien entre los polisacáridos. Interviene en la formación de la estructura proteica ordenada en la matriz, para que se lleve a cabo la correcta mineralización del hueso.

20 En conclusión, el aumento de la síntesis de las partículas a lo largo del tiempo, en asociación con el biomaterial de monetita de porosidad estructurada, compuestas por calcio, fósforo y silicio, indica que se dan las condiciones adecuadas para la formación de las sales de calcio necesarias para que se forme la fase mineral del hueso.

Ejemplo 9: Analisis de la capacidad de secreción autocrina de factores de crecimiento relacionados con la regeneración ósea por parte de las células cuando están dispuestas en el biomaterial de monetita de porosidad estructurada. Potencia

25 Los factores de crecimiento son proteínas producidas por las células óseas que actúan como moduladores de las funciones celulares. Está descrito en la bibliografía que el TGF- β 1 es un factor importante en el remodelado óseo ya que es sintetizado por los osteoblastos potenciando su diferenciación y favoreciendo la síntesis de matriz osteoide (Riancho *et al.*, 2003). El TGF- β 1 tiene efectos quimiotácticos sobre los precursores de los osteoblastos, estimulando su proliferación y la síntesis de colágeno (Fernandez-Tresguerres *et al.*, 2006).

30 Es tanta su implicación en la regeneración ósea, que está siendo utilizado como marcador pronóstico en serología para determinar la capacidad que puede tener un individuo de curar una fractura complicada (Zimmermann, 2005).

35 Para determinar la capacidad que tienen las AMSC prediferenciadas de secretar este factor de crecimiento con o sin biomaterial de monetita de porosidad estructurada, se lleva a cabo la cuantificación del factor soluble en los medios de cultivo. Estos medios proceden del cultivo de células prediferenciadas solas o de células prediferenciadas en contacto con el biomaterial. El procedimiento llevado a cabo fue el siguiente:

- 40 - Disposición de diferentes concentraciones celulares: 0,5-1-2-3-4-5 millones de células prediferenciadas en 6 cm^2 de superficie y en un volumen de 1,5 ml de medio. Cultivo durante 7 días.
 - Disposición de 2×10^6 células prediferenciadas en 6 cm^2 de superficie en un volumen de 1,5 ml de medio de cultivo durante 1, 4, 7, 10 y 15 días de cultivo.
 - Análisis por ELISA de la cantidad de TGF- β 1 soluble.

45 Los resultados muestran que en todos los casos se observa una presencia relevante del factor en el medio (figuras 35-38). Las concentraciones detectadas varían dependiendo del momento del metabolismo celular y del uso que se esté produciendo del factor en la célula.

50 Cuando las células crecen sin el biomaterial de porosidad estructurada, se observa un aumento gradual en la concentración de TGF- β 1 en las concentraciones celulares inferiores, proporcional al número de células por superficie (Figura 35). En las concentraciones superiores se aprecia un ligero descenso o estabilización, que puede ser debido a que el factor esté ejerciendo su función unido al receptor, a que haya ya cumplido su función y comience a degradarse, a que la concentración elevada esté inhibiendo su propia síntesis por un mecanismo de autorregulación.

55 En la figura 36 se representa la secreción del factor de crecimiento por parte de las células prediferenciadas a lo largo del tiempo en cultivo. Se observa un pico en la síntesis y secreción al medio a los 4 días del cultivo, posteriormente un descenso hasta el día 10, a partir del cual, inicia un nuevo aumento en la secreción.

60 Este comportamiento es típico de los factores de crecimiento que actúan según un mecanismo autorregulación:

- 1º: se da la síntesis y secreción al medio.
- 2º: se une a su receptor específico en la superficie de la célula receptora para ejercer su función, momento en el

que se puede observar una disminución de su presencia en el medio de cultivo.

- 3º: si sigue siendo necesario para la activación de determinados procesos celulares, comienza de nuevo su síntesis y secreción al medio para mantener su efecto hasta que la célula determine la inhibición de su síntesis.

5 Cuando las células se encuentran dispuestas en el biomaterial, los resultados demuestran que también son capaces de sintetizar y secretar al medio de cultivo el factor TGF-β1 (Figura 37).

10 La presencia del factor en el medio se correlaciona con el incremento del número de células en el biomaterial, hasta que se produce de nuevo una estabilización de la secreción, que puede ser debida a que no se necesite incrementar los niveles para su actuación.

15 Asimismo, una misma concentración celular dispuesta sobre monetita de porosidad estructurada a lo largo del tiempo en cultivo, aumenta la secreción del factor, lo que puede ir relacionado con el incremento celular a lo largo del tiempo (figura 38). En concreto los resultados muestran que hay un aumento de la secreción desde el día 1 hasta el 10 de cultivo, momento a partir del cual empieza a estabilizarse y descender moderadamente.

20 Este incremento también puede no estar relacionado con un aumento en el número de células, sino deberse a una inducción para potenciar la síntesis de matriz extracelular. A partir del día 10 de asociación, desciende su síntesis o bien el factor se encuentra en su mayoría unido a receptores ejerciendo su función, no observándose de forma libre en el medio de cultivo.

25 En este caso, el mecanismo de autorregulación del factor se regula algo diferente al que se observa cuando las células no crecen sobre la matriz de monetita de porosidad estructurada de la invención, de manera que el incremento en la secreción se mantiene hasta el día 10, descendiendo a partir de este día.

30 En conclusión, las células prediferenciadas que crecen sobre el biomaterial de monetita de porosidad estructurada son capaces de sintetizar y secretar al medio exterior el factor TGF-β1. Como se ha demostrado en el estudio de la expresión génica de este factor, en las células prediferenciadas creciendo en el biomaterial, la expresión del factor se mantiene constante a lo largo del tiempo en cultivo a excepción del día 7 en el que se observaba una ligera menor expresión. Además, la expresión en las células prediferenciadas creciendo con y sin biomaterial es similar. Por ello, cabe suponer que la diferente cuantificación del factor en ambos casos sea debida a una diferencia en la velocidad de unión al receptor y de transmisión de la señal al interior. O también puede que tengan más receptores las células que crecen sobre el biomaterial y el factor se encuentre en su mayoría unido a ellos, lo que supondría una potenciación del proceso de regeneración ósea, por ello la detección del factor soluble en estos casos es menor.

35 En resumen, las células prediferenciadas, creciendo sobre el biomaterial de monetita de porosidad estructurada de la invención sintetizan y secretan al medio de cultivo TGF-β1. Este factor puede favorecer la síntesis de matriz osteoide.

40 **Ejemplo 10: Comparación *in vivo* de las matrices de monetita de porosidad estructurada de la invención frente a matrices de porosidad estructurada de brushita**

45 El biomaterial de monetita estructurada de la presente invención presenta ventajas frente a la brushita, puesto que es más estable y presenta una tasa de reabsorción más adecuada y adaptada al remodelado óseo.

50 Se realizó un estudio para determinar la tasa de reabsorción de los biomateriales de monetita de porosidad estructurada y de biomateriales de brushita con la misma estructura de porosidad que los de la presente invención, mediante la utilización de un modelo de defecto crítico en hueso calvario de conejos. Se incluyeron 6 conejos de la variedad New Zeland en el estudio, utilizando 3 animales para el análisis de la capacidad de reabsorción de cada biomaterial. Para ello, la exposición al cráneo del conejo se llevó a cabo mediante una incisión sagital del cuero cabelludo. A continuación, se diseccionó cuidadosamente el periostio, se prepararon defectos bicorticales de 1 cm de diámetro. En cada animal se dispusieron los biomateriales en uno de los defectos, dejando el contralateral como control. Se irrigó generosamente la zona de la cirugía y se suturó el periostio, los tejidos subcutáneos y el cuero cabelludo utilizando las técnicas quirúrgicas adecuadas.

55 Transcurridas 4, 8 y 12 semanas desde la implantación, se procedió al sacrificio de los animales y se llevó a cabo la recolección de las piezas implantadas, para su análisis histomorfológico. El tiempo más adecuado para la total reabsorción de un biomaterial utilizado para inducir la regeneración ósea en humanos, se estima entre los 6 a 18 meses. Esta tasa de reabsorción es importante puesto que si el biomaterial es muy soluble y la degradación demasiado rápida, los osteoblastos pierden el andamiaje que les va a permitir mantenerse e ir produciendo y disponiendo nueva matriz ósea, sin embargo, si el biomaterial utilizado es demasiado estable, los osteoclastos no podrán producir una degradación sincronizada con la formación de nuevo hueso por parte de los osteoblastos. Por este motivo es necesario aplicar un biomaterial cuya degradación permita el remodelado óseo y que además los iones y productos de degradación no produzcan alteraciones significativas en el pH del entorno y en las células

osteogénicas. En este caso, los resultados mostraron que la zona de implantación no mostró signos de inflamación con ninguno de los biomateriales utilizados. Con ambos biomateriales, el estudio histológico evidenció la formación de nuevo hueso ya desde la semana 4, así como los primeros signos de reabsorción (perforaciones en los biomateriales, zonas de agrupación de osteoclastos). Sin embargo, si bien se observa que la brushita ha sido mayoritariamente reabsorbida a las 12 semanas de la implantación, todavía se puede observar material de monetita, lo que proporciona más estabilidad al proceso de regeneración ósea y más acoplamiento con la fase de remodelado óseo. El aumento del tiempo de reabsorción del biomaterial de monetita de la invención, va a dar lugar a la formación de mayor masa ósea, puesto que los osteoblastos van a contar con más tiempo para la formación y el depósito de nueva matriz ósea mineralizada.

Así, se puede concluir que la tasa de reabsorción de la monetita se encuentra más ajustada al remodelado óseo, manteniendo durante más tiempo el andamiaje adecuado para la colonización de los osteoblastos y para la síntesis de nueva matriz ósea, sin riesgo de formación a hidroxiapatita, debido a una tasa de reabsorción demasiado alta, como puede ocurrir en el caso de la brushita.

Ejemplo 11: Comparación de una realización particular de la matriz de monetita de porosidad estructurada de la invención frente a una matriz de monetita con diferente estructura de porosidad

El biomaterial desarrollado en la presente invención presenta características que son de especial relevancia para conseguir una efectiva regeneración ósea, entre las que se encuentran una microporosidad y macroporosidad homogéneamente distribuida, y su aplicación en forma de conjunto de piezas, lo que va a permitir una mejor adaptación al defecto óseo, una entrada homogénea de los nutrientes, gases y células en toda la zona a reparar, de forma que no se da lugar a zonas necróticas.

Para estudiar la ventaja del biomaterial de la invención y su forma de aplicación, se comparó la capacidad regenerativa de las pastillas de la invención de 5 mm de diámetro, 3 mm de alto y 12 macroporos de 0,5 mm de diámetro separadas 0,5 mm entre sí con respecto a un biomaterial de monetita que presenta la estructura de porosidad del ejemplo 1 de la solicitud de patente US6905516. Dicha matriz, corresponde a un cilindro de 10 mm de diámetro por 10 mm de alto, que presenta un canal central de 2 mm de diámetro y una red hexagonal de poros cilíndricos de 0,5 mm de diámetro, paralelos al macroporo central de 2 mm, y separados por una distancia de 1 mm entre sí. Así, dicha matriz no presenta un control de diámetro de poros homogéneo, y debe ser aplicada en una única pieza, de forma que el tamaño completo se ajuste al defecto óseo.

Se llevó a cabo un análisis de la formación de nuevo hueso y vascularización en la zona de la implantación de los dos tipos de biomateriales. Para la experimentación *in vivo*, se utilizaron 6 ovejas a las que se realizó un defecto crítico en la tibia y una estabilización por técnicas de osteosíntesis. En el defecto creado, se aplicó en 3 de ellas un conjunto de piezas del biomaterial de monetita de porosidad estructurada de la invención y en otras 3 una pieza única de biomaterial ajustada al tamaño del defecto, dejando en todas ellas la pata adyacente como control (con formación del defecto crítico y estabilización de la fractura pero sin relleno de biomaterial). Previamente a la implantación de los biomateriales, estos fueron sembrados con un número igual de células madre mesenquimatosas del tejido adiposo obtenido de las ovejas.

El análisis del nuevo tejido óseo formado y de la reabsorción de ambos tipos de biomateriales se realizó mediante un control radiográfico continuo y un estudio histológico a los 3 y 6 meses de la implantación. Las radiografías seriadas permiten observar una completa integración del biomaterial de porosidad estructurada de la invención en la zona del implante, así como una reabsorción activa de dicho biomaterial, que todavía persiste a los 6 meses, ya que su tasa de degradación se encuentra ajustada al remodelado óseo con este diseño. A nivel radiográfico no se observan cambios en el biomaterial dispuesto como bloque único en la zona implantada. El análisis histomorfométrico permitió confirmar a los 3 meses de la implantación una colonización de los osteoblastos y osteoclastos del hueso en toda la estructura del biomaterial de monetita de porosidad estructurada de la invención, y la formación de nuevo hueso de forma homogénea, con una total integración del mismo a los 6 meses con una incipiente red vascular que va a permitir la supervivencia del nuevo tejido formado sin formación de zonas necróticas. Sin embargo, en el interior del bloque único, prácticamente la totalidad del nuevo tejido formado se restringe a la zona periférica al implante, quedando su zona interior con una significativa inferior colonización de las células del tejido adyacente y sin signos de formación de nuevos vasos sanguíneos. La distribución homogénea de los poros con un diámetro de 500 μm y una separación entre ellos también de 500 μm en el biomaterial, produce una gran superficie de contacto tanto en la zona superficial como en el interior del biomaterial de la invención, lo que mejora la capacidad de interacción con el tejido de la zona dañada, produciéndose zonas de actividad en cuanto a la generación de nuevo hueso en todas las zonas del biomaterial de forma simultánea.

Estos resultados permiten concluir que el tejido receptor de la implantación interacciona de forma significativamente más adecuada con el biomaterial de la invención, para dar lugar a la formación de nuevo tejido óseo vascularizado de forma homogénea. Sin embargo, la utilización de un bloque único de monetita del ejemplo 1 de la solicitud de patente US6905516, dificulta la interrelación e integración en la zona del defecto óseo. La formación de nuevo hueso

y la colonización celular en su interior es significativamente menor incluso a los 6 meses de la implantación.

Por otro lado, en la mayoría de las ocasiones los defectos óseos en los pacientes no forman formas perfectas, como ocurre cuando estos defectos se crean en las ovejas como parte de un estudio experimental. Los defectos óseos son muy dispares y los bordes de la fractura, en numerosas ocasiones, son muy irregulares. En algunos casos, el espacio que constituye el defecto óseo es muy limitado, como ocurre por ejemplo en la pseudoartrosis hipertrófica, por lo que introducir un bloque único preformado que se acople en la zona es muy complicado y no es capaz de amoldarse a una zona deformada. La utilización del diseño de la invención, un conjunto de piezas de biomaterial de monetita de pequeño tamaño con una estructuración homogénea de macroporos, permite su adaptación a defectos óseos complicados y de diferentes formas y dimensiones, de manera que la zona afectada queda totalmente expuesta al biomaterial y a las células aportadas para activar el proceso de curación.

Bibliografía

- 15 - Chow LC, Markovic M, Takagi S, 2003. A dual constant composition titration system as an *in vivo* resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials. J Biomed Mater Res B: Appl Biomater 65: 245-251.
- 20 - Constanz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, mckinney L, Goodman SB, Gunasekaren S, Delaney DC, Ross J, Poser RD, 1998. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. J Biomed Mater Res B: appl Biomater 43: 451-461.
- 25 - De Boever AL & De Boever JA, 2005. Guided bone regeneration around nonsubmerged implants in narrow alveolar ridges: a prospective long-term clinical study. Clinical Oral Implants Research 16: 549-556.
- Egli PS, Muller W, Schenk RK, 1988. Porous Hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bone ingrowth and implant substitution. Clin Orthop 232: 127-138.
- 30 - Fernandez-Tresguerres I, Alobera MA, del Canto M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. Med. oral patol. oral cir.bucal (Internet) v.11 n.2, Madrid, mar. 5 abr. 2006.
- Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel β -TCP/DCPD granulate. J Clin Periodontol 2006; 33: 922-928.
- 35 - Franco J, Souto A, Rey P, Uitian F, Martinez Insua A. 2006. Procesamiento cerámico de B-TCP para la fabricación de piezas implantables. Bol. Soc. Esp. Ceram. V., 45 (4) 265-270.
- 40 - Gimeno MD. Sustitutivos óseos en fracturas del radio distal. Patología del Aparato Locomotor, 2007; 5 Supl. II: 82-90. Frayssinel P, Vidalain JP, Rauz X, Cartillier JC, Rouquet N, 1999. Hydroxiapatite particle migration. European journal of Orthopaedic surgery & traumatology (9) 2: 95-98.
- 45 - Gbureck U, Hölzel T, Klammert U, Würzler K, Müller FA, Barralet JE. Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes made by 3D powder printing. Adv Funct Mater 2007; 17: 3940-5. Herron S, Thordarson DB, Winet H, Luk A, Bao JY, 2003. Ingrowth of bone into absorbable bone cement: An *in vivo* microscopic evaluation. Am J Orthop 12: 581-584.
- 50 - Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores reguladores de la reabsorción ósea. Rev Metab Oseo Min 2003; 1(2): 51-66. Schnettler R, Stahl PJ, Alt V, Pavlidis T, Dingledein E, Wenish S, 2004. Calcium Phosphate-Based bone Substitutes. Eur J Trauma 30: 219-229.
- Schwarz K. Significance and functions of silicon in warm-blooded animals. Review and Outlook. Biochemistry of Silicon and Related Problems. Plenum. New York, 1977: 207-230. Carlisle EM. Silicon. Handbook of nutritionally essential mineral elements. Dekker. New York, 1997: 603-618.
- 55 - Suba Z, Takacs D, Gyulai-Gaal S, Kovacs K, 2004. Facilitation of beta-tricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study. International Journal of oral and Maxillofacial Implants, 19: 832-838.
- 60 - Sugawara A, Fujikawwa K, Takagi S, Chow LC, Nishiyama M, Murai S. Histopathological and cell enzyme studies of calcium phosphate cements. Dent Mater J 2004; 23: 613-620. Stubbs D, Deakin P, Chapman-Sheath P, Bruce J, Debes W, Gillies RM, Walha WR, 2004. *In vivo* evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. Biomaterials 25: 5037-5044.

- Takahashi Y, tabata Y, 2004. Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 15 (1): 41-57.
- 5 - Tamini FM, Torres J, Tresguerres I, Blanco L, López-Cabarcos E, 2006. Vertical bone augmentation with granulated brushite cement set in glycolic acid. *Int J Biomed Mater Res* 80a: 1-10.
- Tamini FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ, 2006. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-OssR and a novel B-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol* 33: 922-928.
- 10 - Tas C & Bhaduri SB, 2004. Chemical processing of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: its conversion of hydroxiapatite. *Journal of American Ceramic Society* 87: 2195-2200.
- Taylor JC, Cuff SE, Leger JP, Morra A, Anderson GI, 2002. In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 17: 321-330.
- 15 - Trisi P, Rao W, Rebaudi A, Fiore P, 2003. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeration in human artificial jawbone defects. *International Journal of periodontics restorative. Dentistry* 23: 69-77.
- 20 - Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseus integration and degradation? *Clin Oral Implants* 2003 Apr; 14 (2): 213-8.
- 25 - G.Zimmermann, P.Henle, M.Küsswetter, A.Moghaddam, A.Wentzensen, W.Richter, S.Weiss. TGF- β 1 as a marker of delayed fracture healing. *Bone*, 2005 (36): 779-785.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Biomaterial en forma de conjunto de piezas, en el que cada parte es una matriz de monetita de porosidad estructurada **caracterizada por** presentar en su estructura macroporos cilíndricos verticales de entre 350 y 650 μm de diámetro, que atraviesan longitudinalmente la matriz de un extremo a otro, existiendo una separación de entre 0,4-0,6 mm entre cada macroporo.
- 10 2. El biomaterial según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dichos macroporos presentan un diámetro de 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$.
3. El biomaterial según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la distancia entre macroporos es de 0,5 mm $\pm 60 \mu\text{m}$ entre sí.
- 15 4. El biomaterial según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el contenido en monetita de la matriz es al menos del 90 %.
5. El biomaterial según la reivindicación 4, **caracterizado porque** el contenido en monetita de la matriz es del 95 %.
- 20 6. El biomaterial según las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizado porque** el contenido en monetita de la matriz es del 100 %.
7. El biomaterial según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la matriz tridimensional puede obtenerse por transformación térmica de un material precursor.
- 25 8. El biomaterial según la reivindicación 7, **caracterizado porque** el material precursor que es transformado térmicamente a monetita consiste en una mezcla de una fase sólida compuesta por fosfatos cálcicos básicos, fosfatos cálcicos ácidos, un porógeno y un retardante, que se fragua por la adición de agua destilada.
- 30 9. El biomaterial según la reivindicación 8, **caracterizado porque** la relación molar de fosfato básico/fosfato ácido es de 1,6-1,8, la concentración de porógenos es de 1-20 % en peso, la de retardante es de entre 0,4-0,6 % en peso y la proporción (P/L) es de 3.
- 35 10. El biomaterial según la reivindicación 9, **caracterizado porque** la relación molar de fosfato básico/fosfato ácido es de 1,785, la concentración de porógeno es de 3-10 % en peso y la de retardante es de 0,54 % en peso.
- 40 11. El biomaterial según las reivindicaciones 7 a 10, **caracterizado porque** el fosfato cálcico ácido es monofosfato cálcico, el fosfato cálcico básico es fosfato tricálcico beta, el agente porógeno carbonato cálcico y el retardante es pirofosfato sódico.
12. El biomaterial según las reivindicaciones 7 a 11, **caracterizado porque** el material precursor es brushita.
13. El biomaterial según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la matriz tridimensional de monetita de porosidad estructurada está presente en forma de pastillas, láminas o cilindros.
- 45 14. El biomaterial según la reivindicación 13, **caracterizado porque** la matriz tridimensional biocompatible de monetita de porosidad estructurada consiste en un cilindro con un diámetro de base de entre 2 y 50 mm y con una altura de entre 1 y 50 mm.
- 50 15. El biomaterial según la reivindicación 14, **caracterizado porque** dicho cilindro presenta un diámetro de base entre 2 y 15 mm y una altura de entre 1 y 5 mm.
16. El biomaterial según las reivindicaciones 14 o 15, **caracterizado porque** la matriz tridimensional biocompatible de monetita de porosidad estructurada presenta una zona perimetral mínima de 0,5 mm sin macroporos.
- 55 17. El biomaterial según la reivindicación 16, **caracterizado porque** dicho cilindro presenta un diámetro de base de 10 mm, una altura de 5 mm, y 64 macroporos cilíndricos con un diámetro de 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados 0,5 mm $\pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, que atraviesan longitudinalmente la matriz, respetando una zona perimetral de 0,5 mm desde el borde de dicho cilindro hacia el centro del mismo que queda sin macroporos.
- 60 18. El biomaterial según la reivindicación 16, **caracterizado porque** dicho cilindro presenta un diámetro de base de 10 mm, una altura de 3 mm, y 64 macroporos cilíndricos con un diámetro de 500 $\mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados 0,5 mm $\pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, que atraviesan longitudinalmente la matriz, respetando una zona perimetral de 0,5 mm desde el borde de dicho cilindro hacia el centro del mismo que queda sin macroporos.

19. El biomaterial según la reivindicación 16, **caracterizada porque** dicho cilindro presenta un diámetro de base de 8 mm, una altura de 5 mm, y 39 macroporos cilíndricos con un diámetro de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, que atraviesan longitudinalmente la matriz respetando una zona perimetral de 0,5 mm desde el borde de dicho cilindro hacia el centro del mismo que queda sin macroporos.
- 5 20. El biomaterial según la reivindicación 16, **caracterizado porque** dicho cilindro presenta un diámetro de base de 8 mm, una altura de 3 mm, y 39 macroporos cilíndricos con un diámetro de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, que atraviesan longitudinalmente la matriz respetando una zona perimetral de 0,5 mm desde el borde de dicho cilindro hacia el centro del mismo que queda sin macroporos.
- 10 21. El biomaterial según la reivindicación 16, **caracterizada porque** dicho cilindro presenta un diámetro de base de 7 mm, una altura de 5 mm, y 28 macroporos cilíndricos con diámetro de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, que atraviesan longitudinalmente la matriz respetando una zona perimetral de 0,5 mm desde el borde de dicho cilindro hacia el centro del mismo que queda sin macroporos.
- 15 22. El biomaterial según reivindicación 16, **caracterizado porque** dicho cilindro presenta un diámetro de base de 7 mm, una altura de 3 mm, y 28 macroporos cilíndricos con un diámetro de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, que atraviesan longitudinalmente la matriz respetando una zona perimetral de 0,5 mm desde el borde de dicho cilindro hacia el centro del mismo que queda sin macroporos.
- 20 23. El biomaterial según la reivindicación 16, **caracterizado porque** dicho cilindro presenta un diámetro de base de 5 mm, una altura de 3 mm, y 12 macroporos cilíndricos con un diámetro de $500 \mu\text{m} \pm 60 \mu\text{m}$, uniformemente separados $0,5 \text{ mm} \pm 60 \mu\text{m}$ entre sí, que atraviesan longitudinalmente la matriz respetando una zona perimetral de 0,5 mm desde el borde de dicho cilindro hacia el centro del mismo que queda sin macroporos.
- 25 24. Un método de síntesis de una matriz tridimensional de monetita de porosidad estructurada del biomaterial según las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizado por** comprender las etapas de:
- 30 1) Mezcla de una fase sólida compuesta por fosfatos cálcicos básicos, fosfatos cálcicos ácidos, un porógeno y un retardante, que se fragua por adición de agua destilada, dando lugar a la fase líquida.
2) Aplicación de al menos un molde en el cemento durante el fraguado para generar macroporos cilíndricos verticales de entre 350 y $650 \mu\text{m}$ de diámetro, separados uniformemente $0,4-0,6 \text{ mm}$ entre sí.
3) Esterilización del material precursor formado y transformación térmica a monetita.
- 35 25. El método de síntesis según la reivindicación 24, **caracterizado porque** en la etapa 1 la relación molar de fosfato básico/fosfato ácido es de 1,6-1,8, la concentración de porógeno es 1-20 % en peso, la de retardante de entre 0,4-0,6 % en peso y la proporción (P/L) es de 3.
- 40 26. El método de síntesis según la reivindicación 25, **caracterizado porque** en la etapa 1 la relación molar de fosfato básico/fosfato ácido es de 1,785, la concentración de porógenos de 3-10 % en peso y la de retardante es de 0,54 % en peso.
- 45 27. El método de síntesis según las reivindicaciones 24-26, **caracterizado porque** en la etapa 1 el fosfato cálcico ácido es monofosfato cálcico, el fosfato cálcico básico es fosfato tricálcico beta, el agente porógeno carbonato cálcico y el retardante es pirofosfato sódico.
- 50 28. El método de síntesis según las reivindicaciones 24 a 27, **caracterizado porque** el producto de la fase 1 es brushita.
- 55 29. El método de síntesis según las reivindicaciones 24 a 28, **caracterizado porque** en la etapa 3, la esterilización térmica se lleva a cabo por autoclavado.
- 60 30. El método de síntesis según la reivindicación 29, **caracterizado porque** dicho autoclavado se lleva a cabo a $120-130 \text{ }^\circ\text{C}$ y durante 24-25 minutos.
- 65 31. El método según las reivindicaciones 24 a 30, **caracterizado porque** en la etapa 2 el molde empleado tiene una distribución homogénea de punzones de $350-650 \mu\text{m}$ de diámetro, separados uniformemente entre sí a $0,4-0,6 \text{ mm}$ y que se forma con silicona, metal o plástico resistente.
- 70 32. El método según la reivindicación 31, **caracterizado porque** previo al empleo del molde según la reivindicación 31, se emplea un molde de silicona que presenta forma de cilindro con diámetro de base entre 2 y 50 mm y de altura entre 1 y 50 mm.

33. El método según la reivindicación 32, **caracterizado porque** dicho molde de silicona presenta forma de cilindro con diámetro de base de entre 2 y 15 mm y con altura de entre 1 y 5.

5 34. Biomaterial en forma de un conjunto de piezas, en el que cada parte es una matriz tridimensional compatible de monetita de porosidad estructurada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizadas porque** adicionalmente comprenden células.

10 35. Biomaterial según la reivindicación 34, **caracterizado porque** dichas células son células mesenquimatosas, osteoblastos, osteoclastos, osteocitos, células endoteliales o combinaciones de ellas.

36. Biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, 34 y 35 para su uso en la regeneración de la estructura ósea.

15 37. Biomaterial para su uso según la reivindicación 36, **caracterizado porque** dicha regeneración de estructura ósea se lleva a cabo para combatir la osteoporosis.

Fig. 1

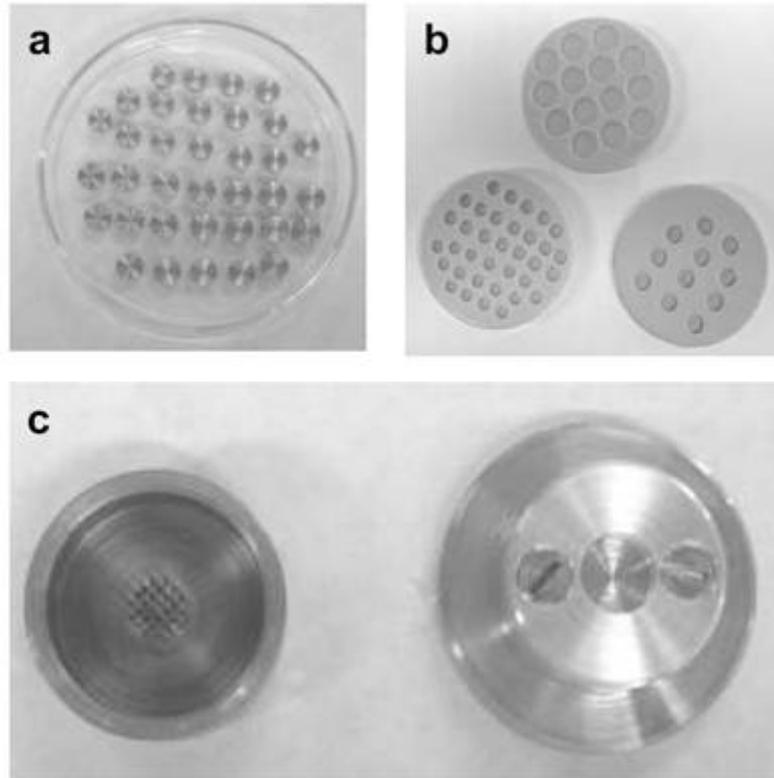


Fig. 2

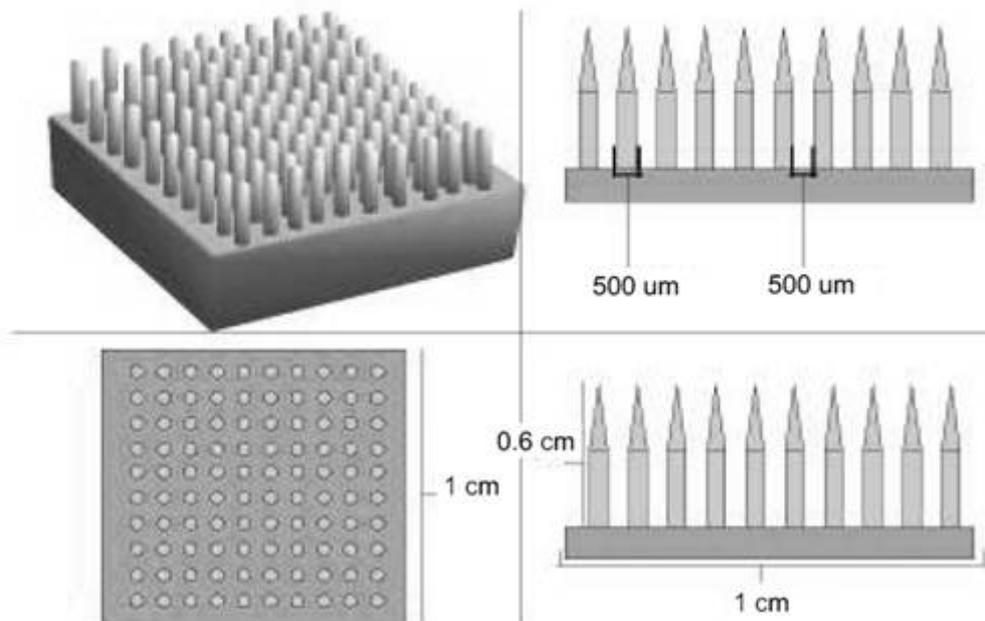


Fig. 3

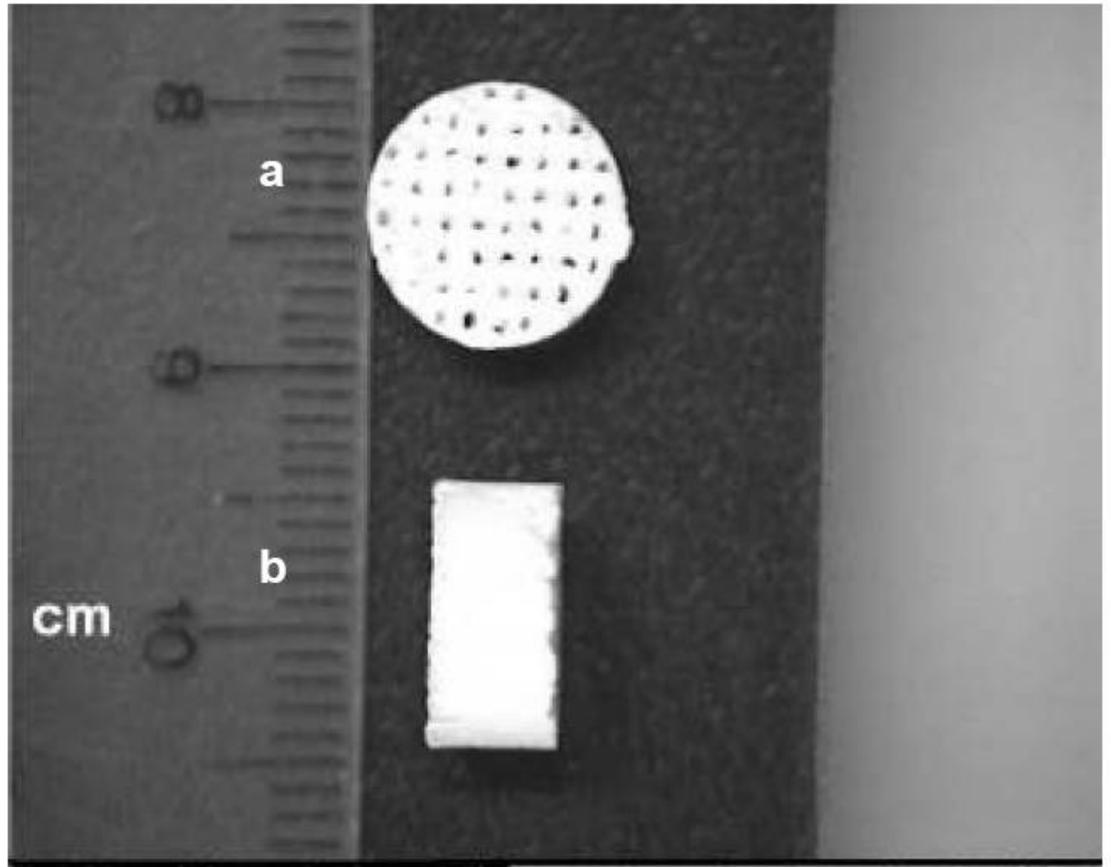


Fig. 4

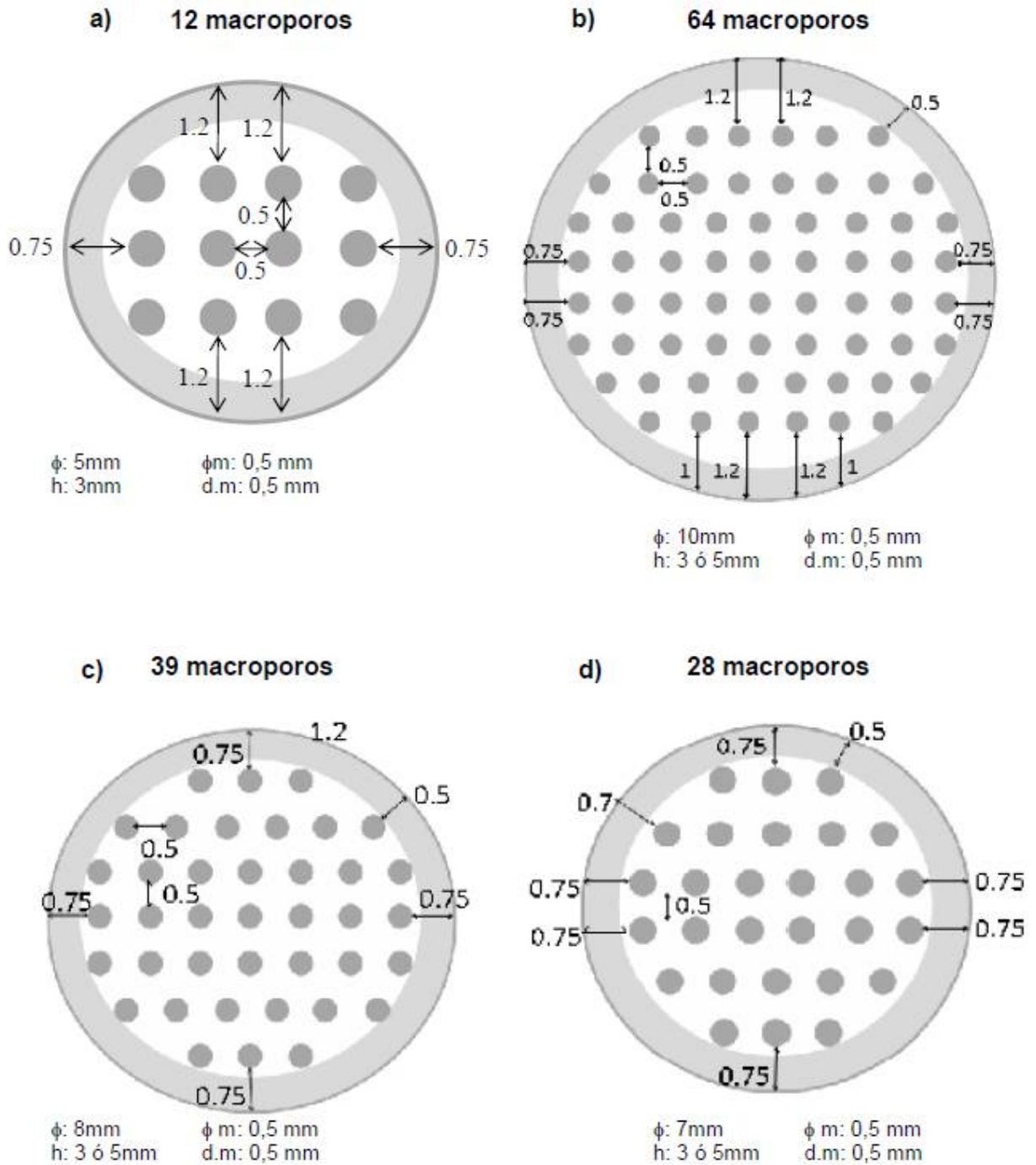


Fig. 5

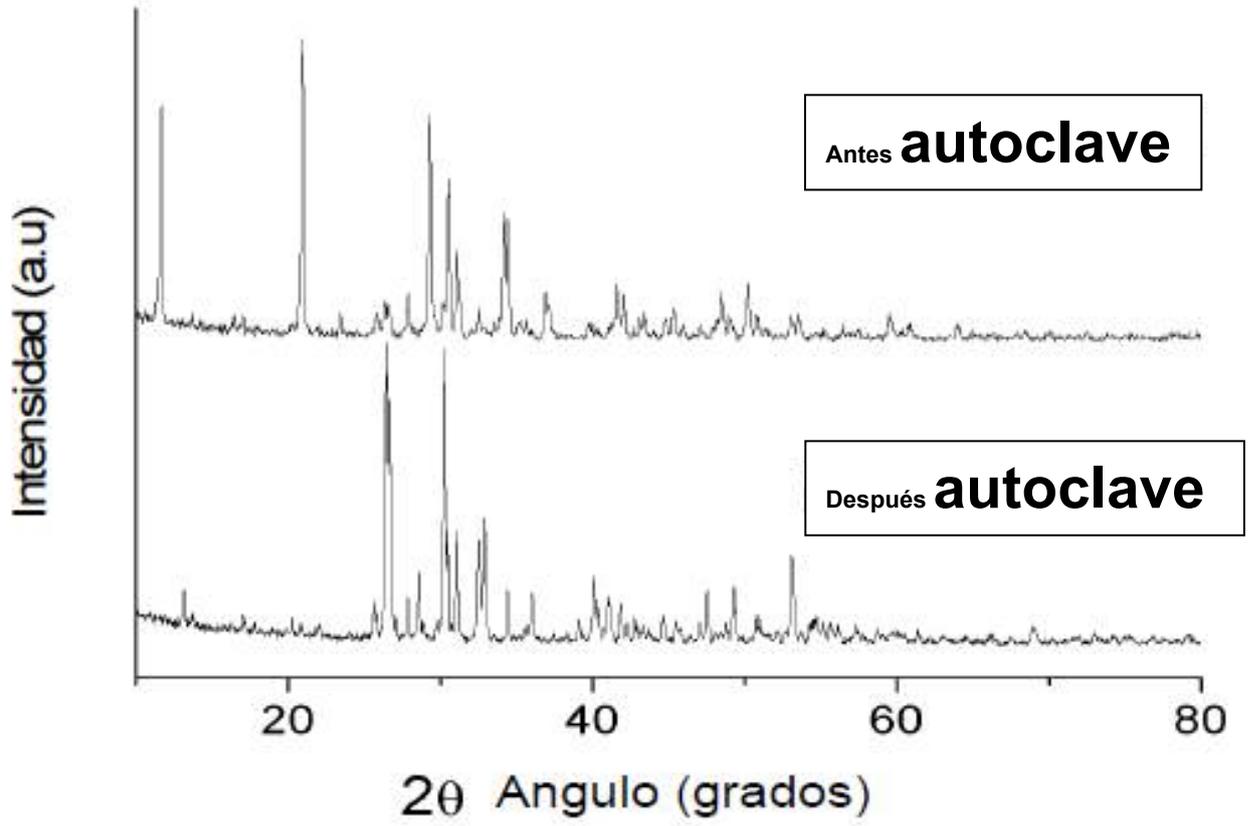


Fig. 6

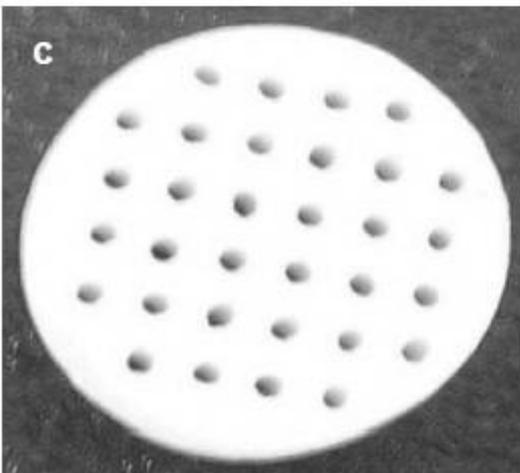
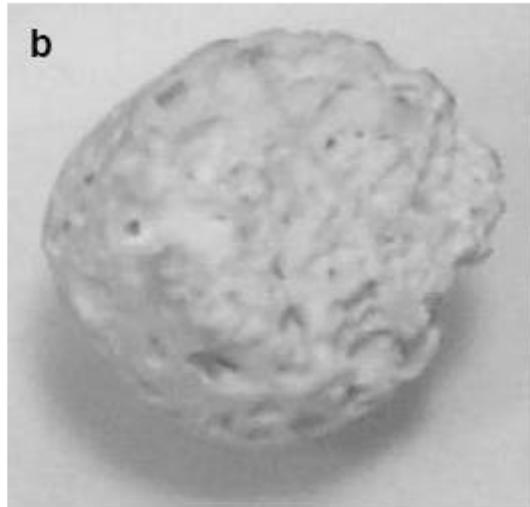
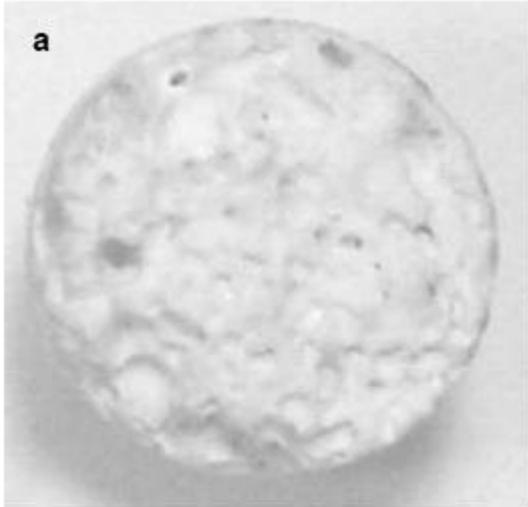


Fig. 7

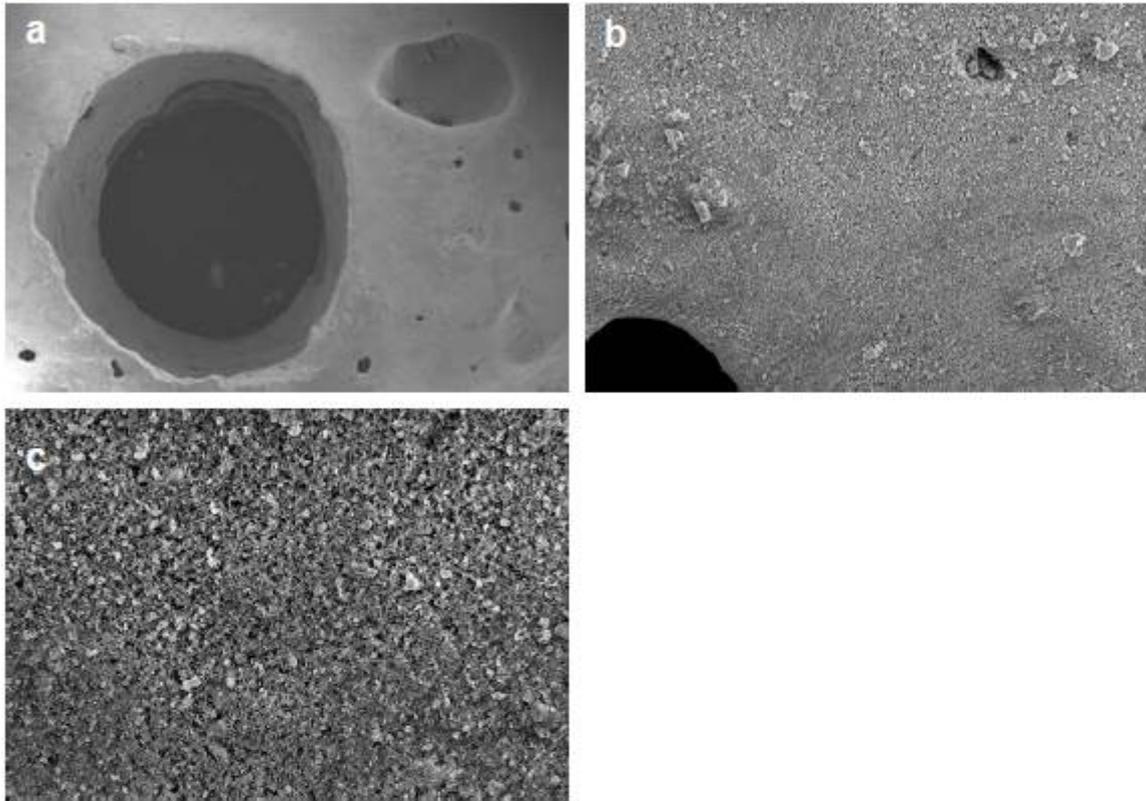


Fig. 8

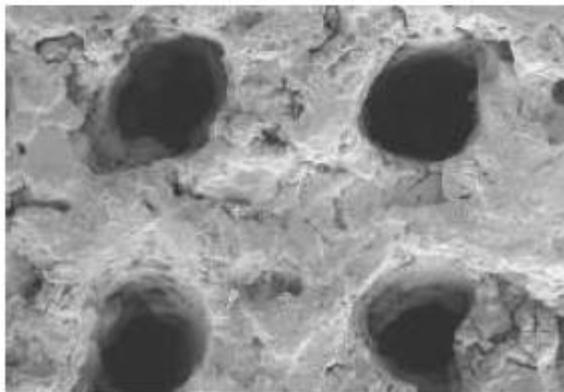


Fig. 9

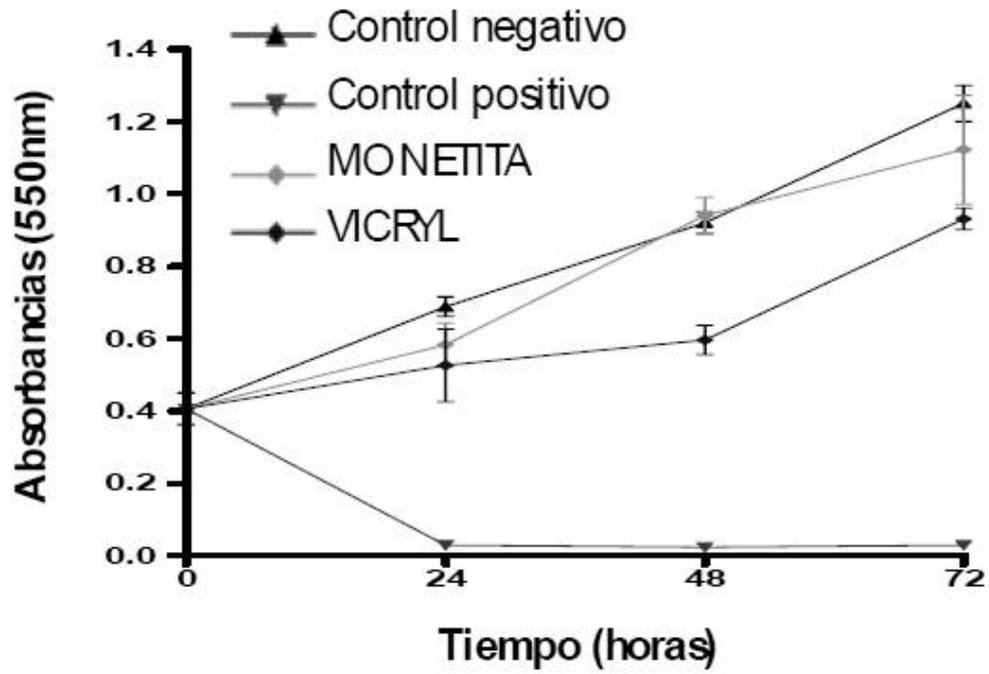


Fig. 10

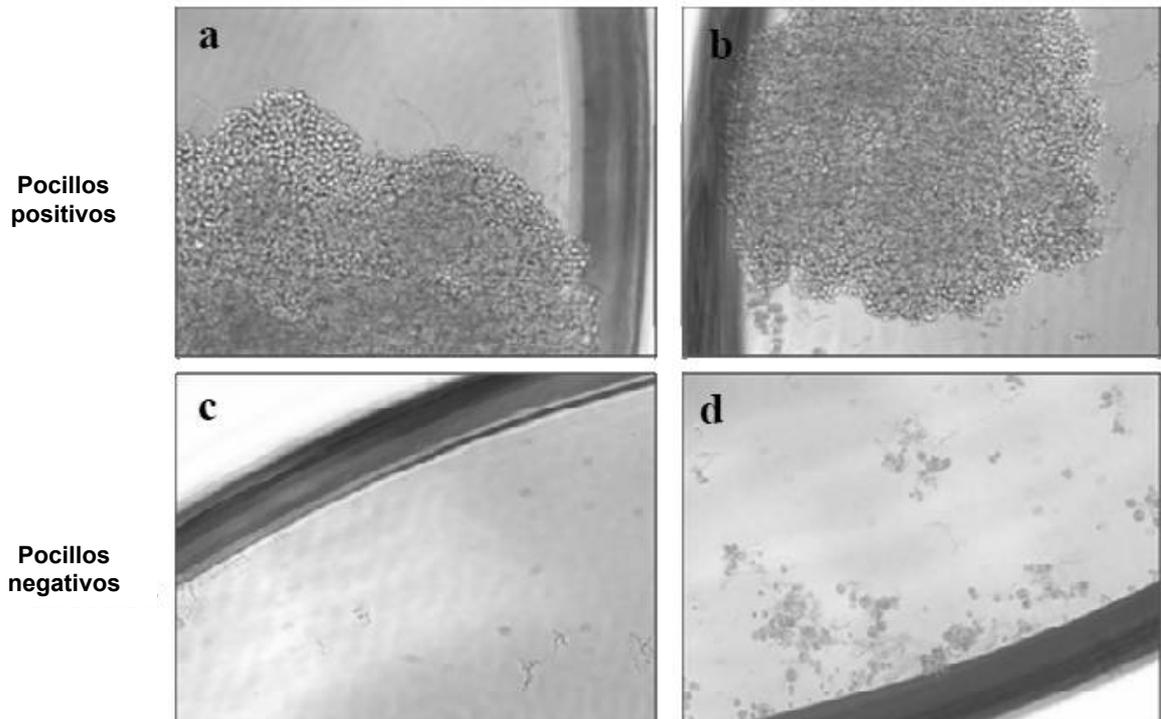


Fig. 11

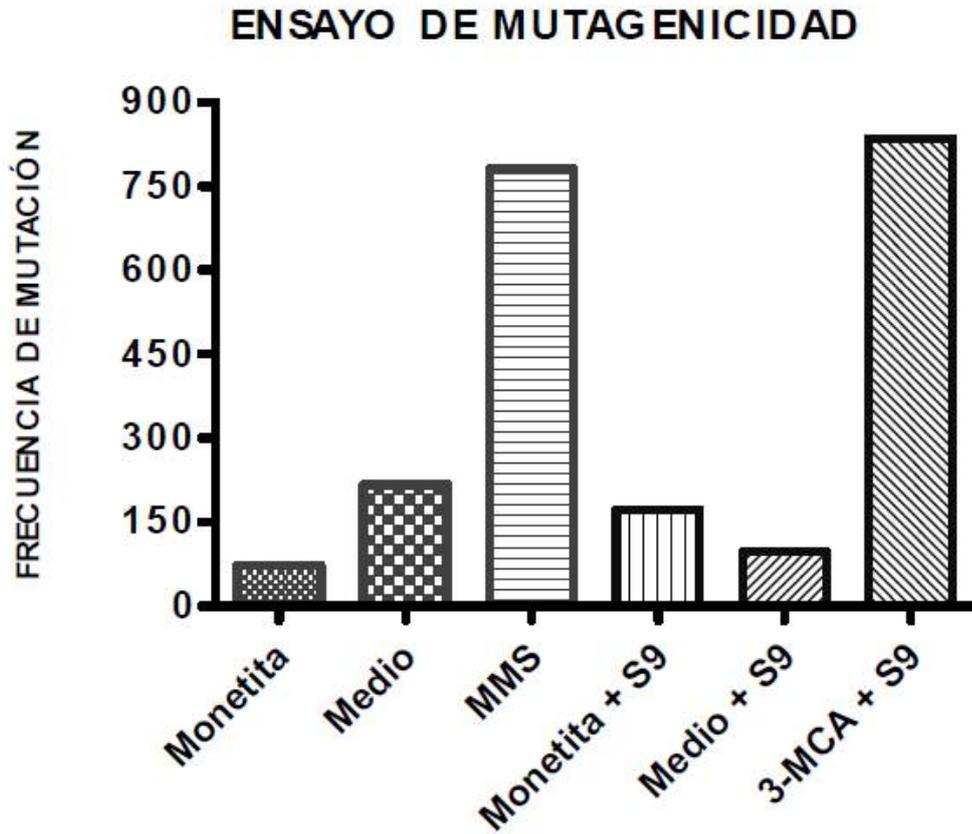


Fig. 12

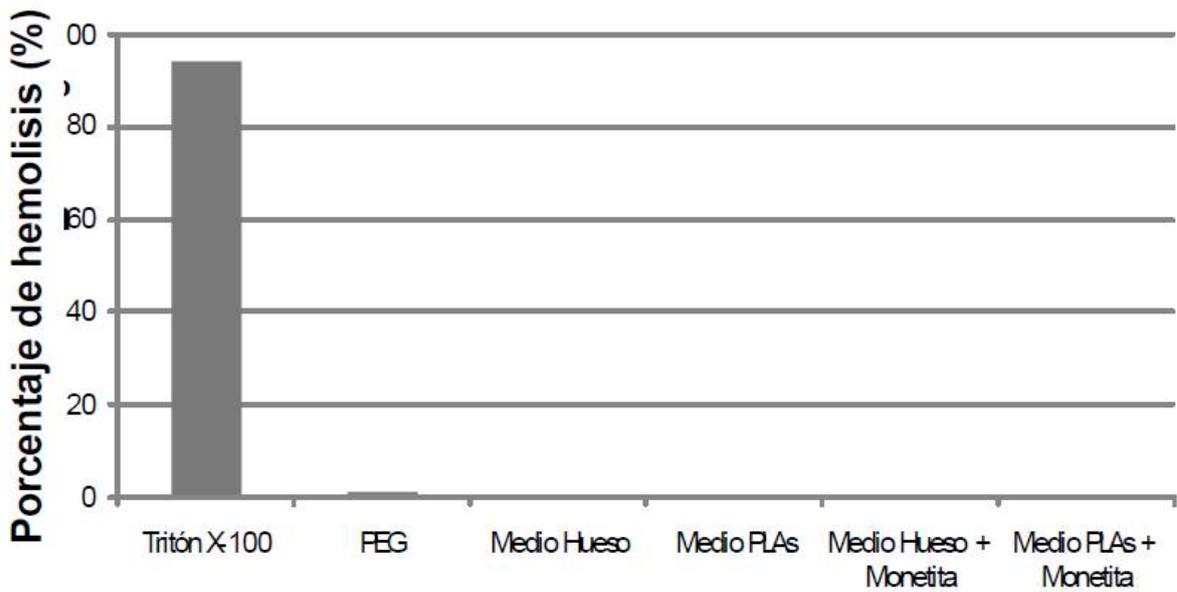


Fig. 13

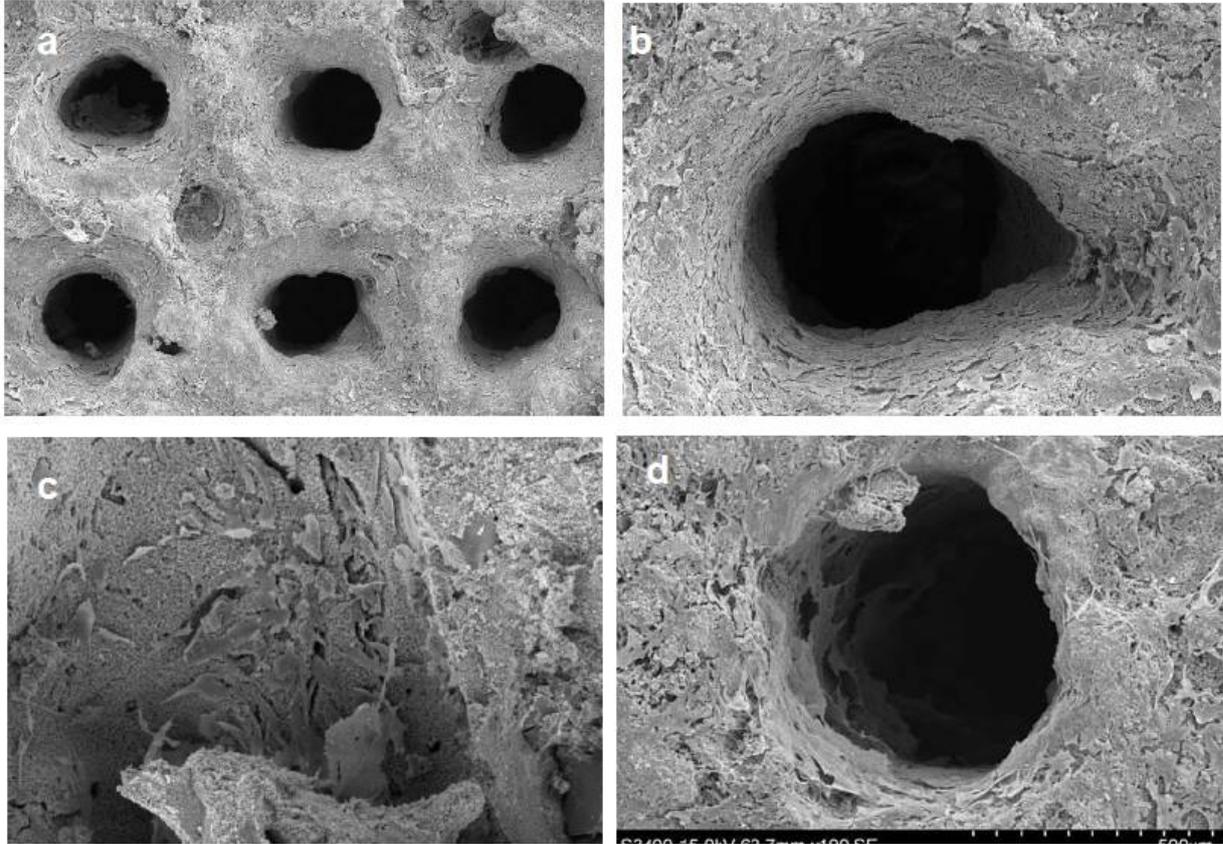


Fig. 14

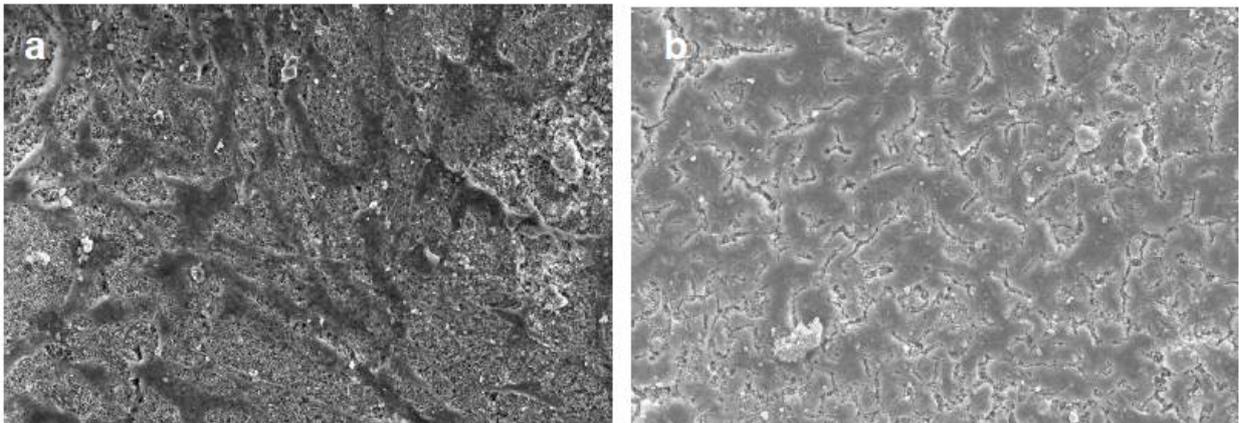


Fig. 15

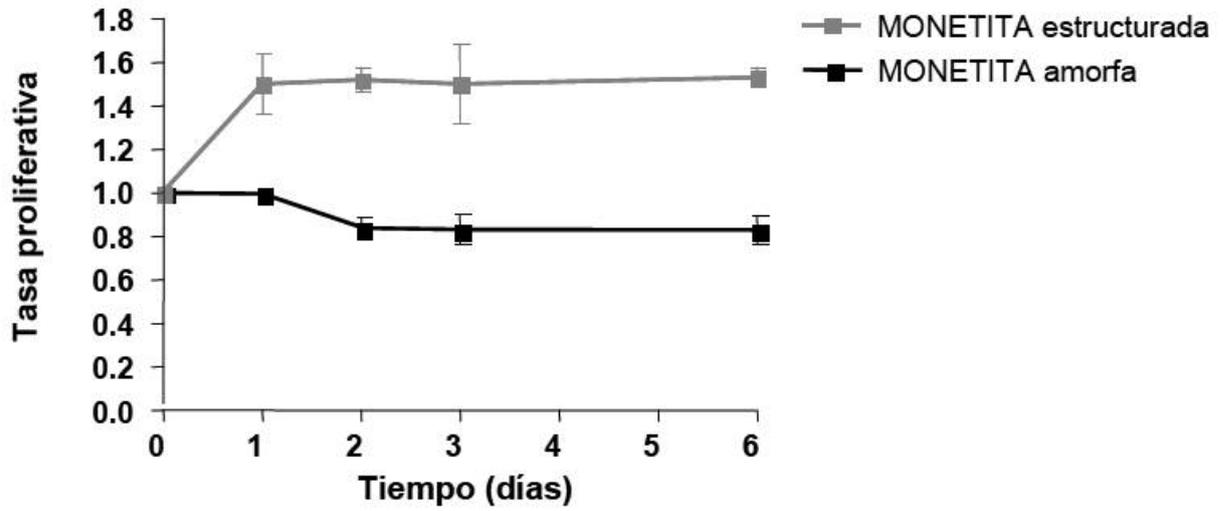


Fig. 16

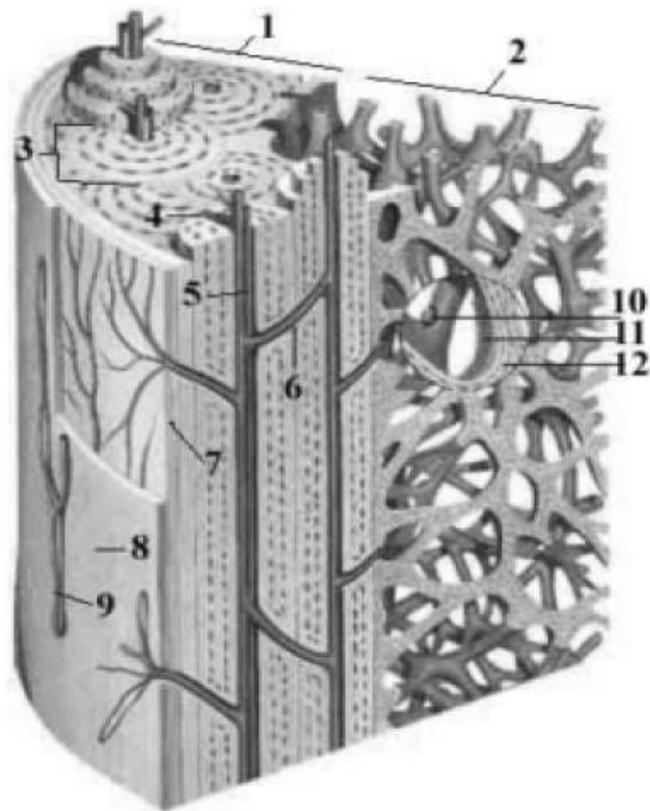


Fig. 17

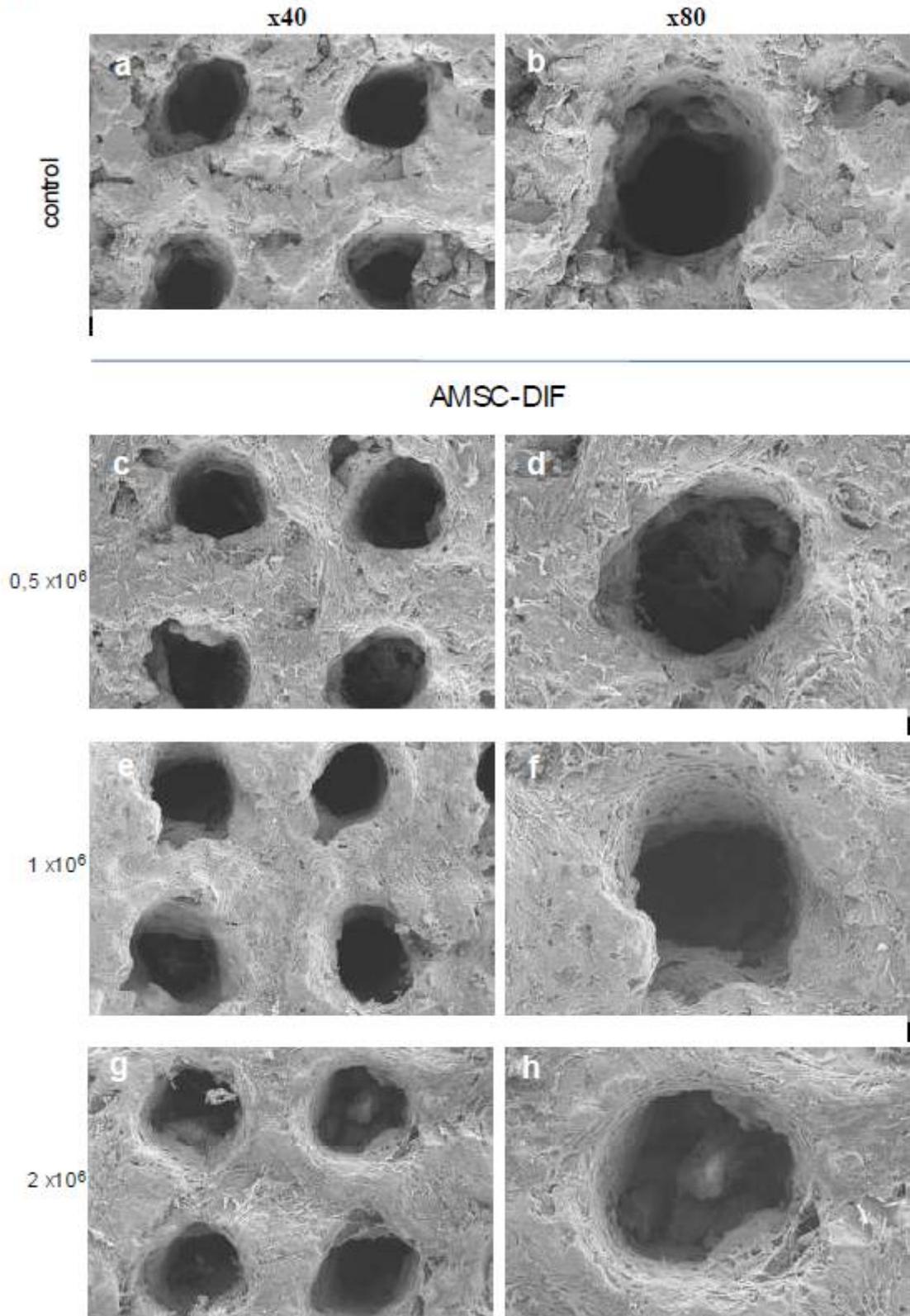


Fig. 18

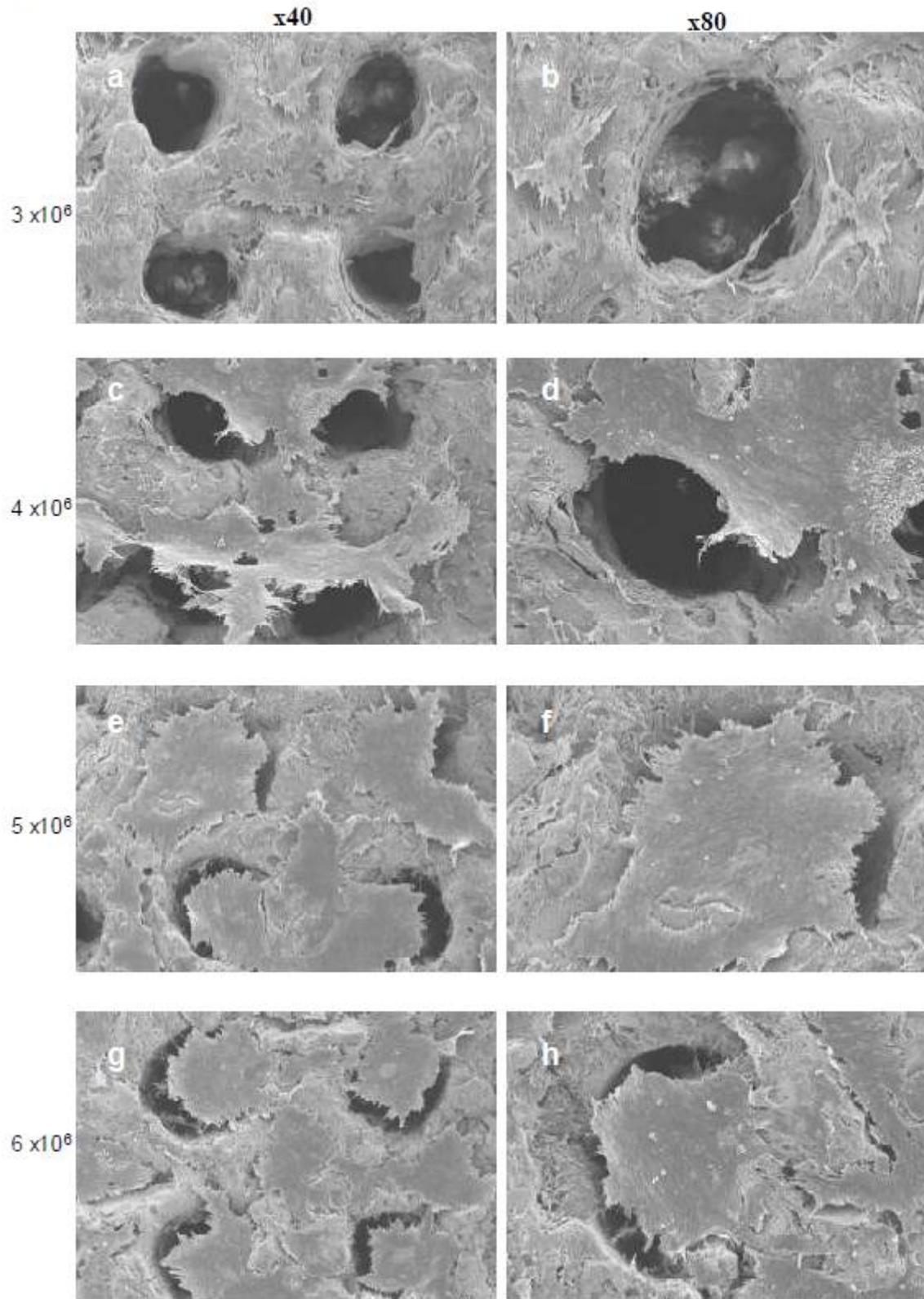
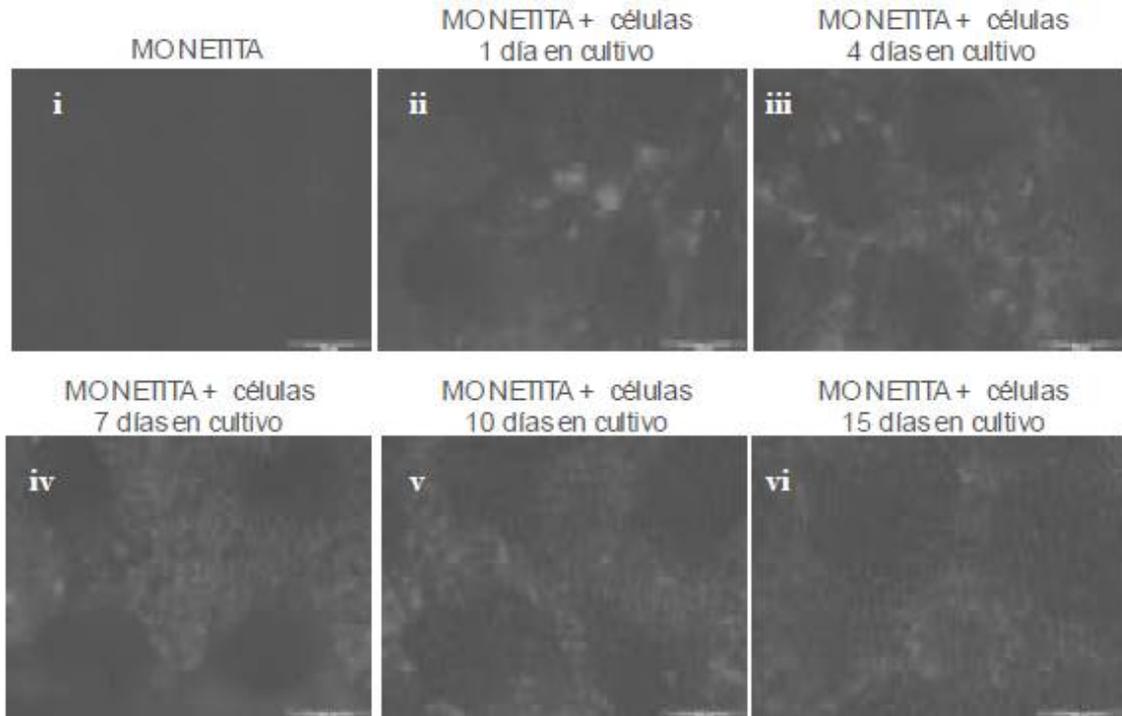


Fig. 19

a) *TOPVIEW*



b) *SIDEVIEW*

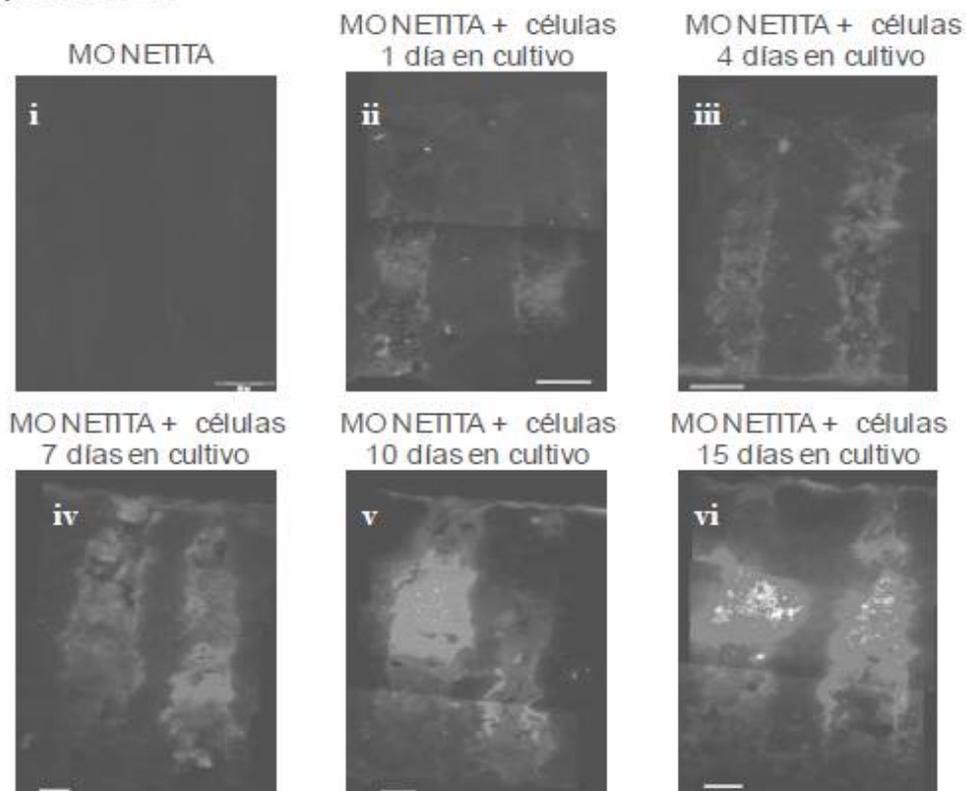


Fig. 20

TOPVIEW

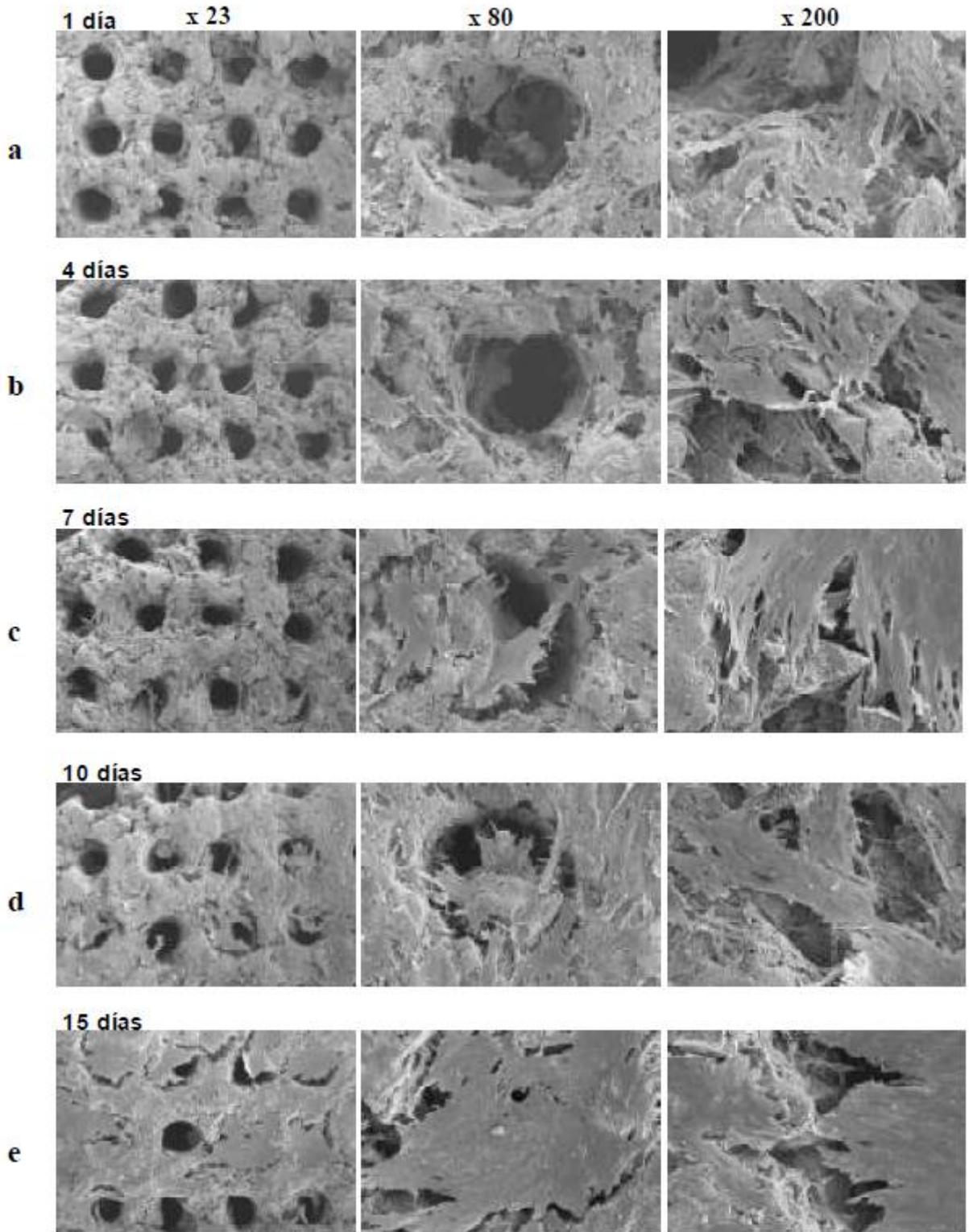


Fig. 21

SIDEVIEW

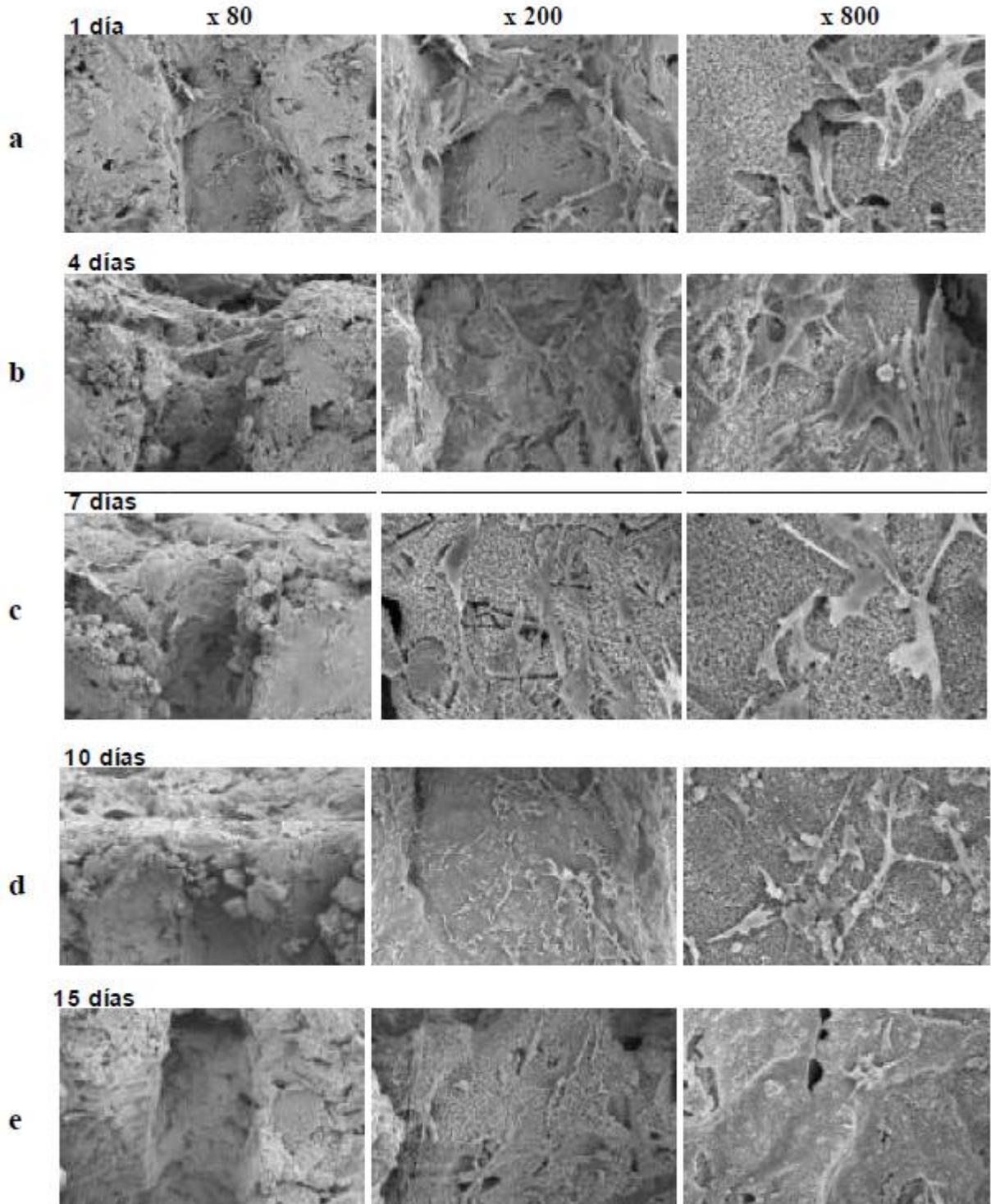


Fig. 22

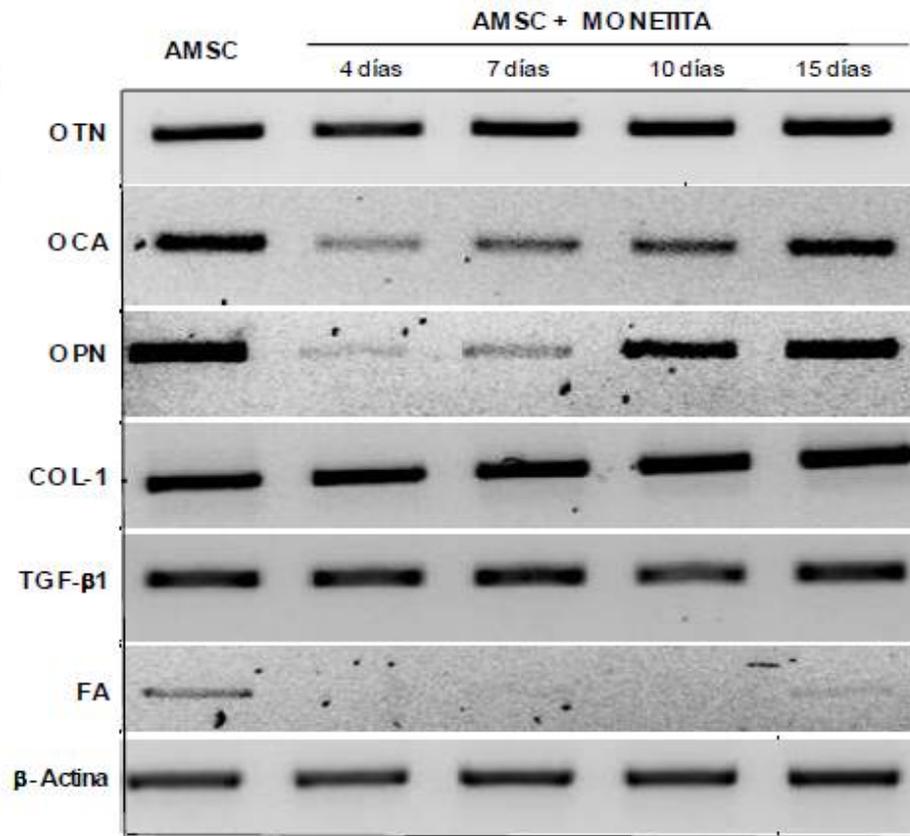


Fig. 23

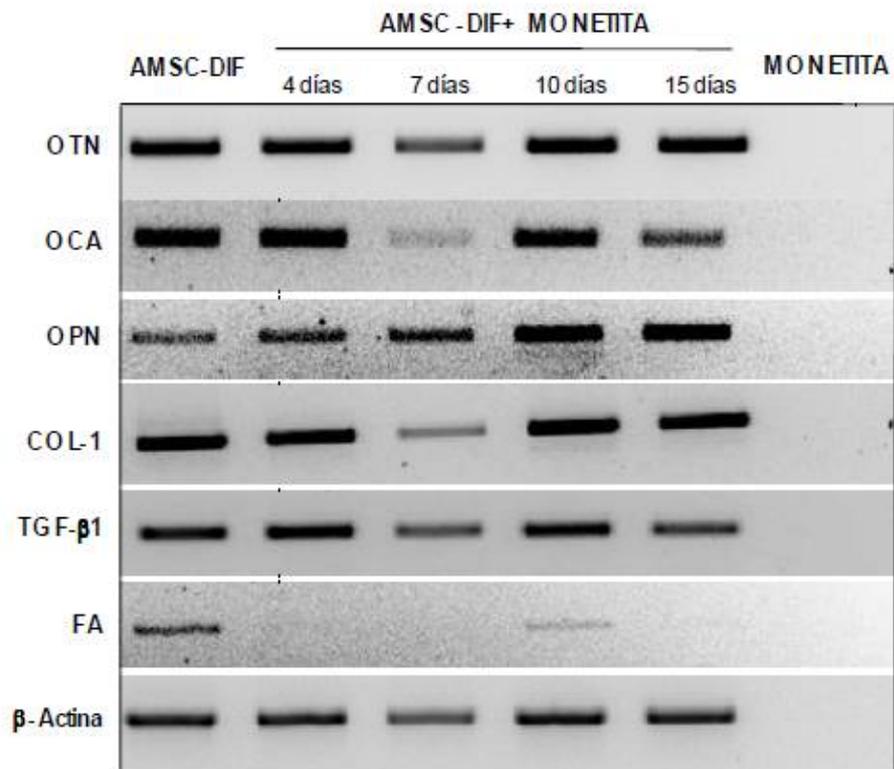


Fig. 24

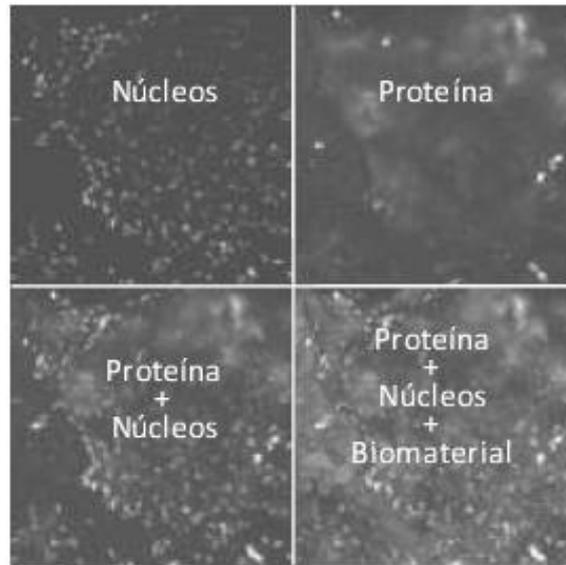


Fig. 25

COLAGENO TIPO-1 (TOPVIEW)

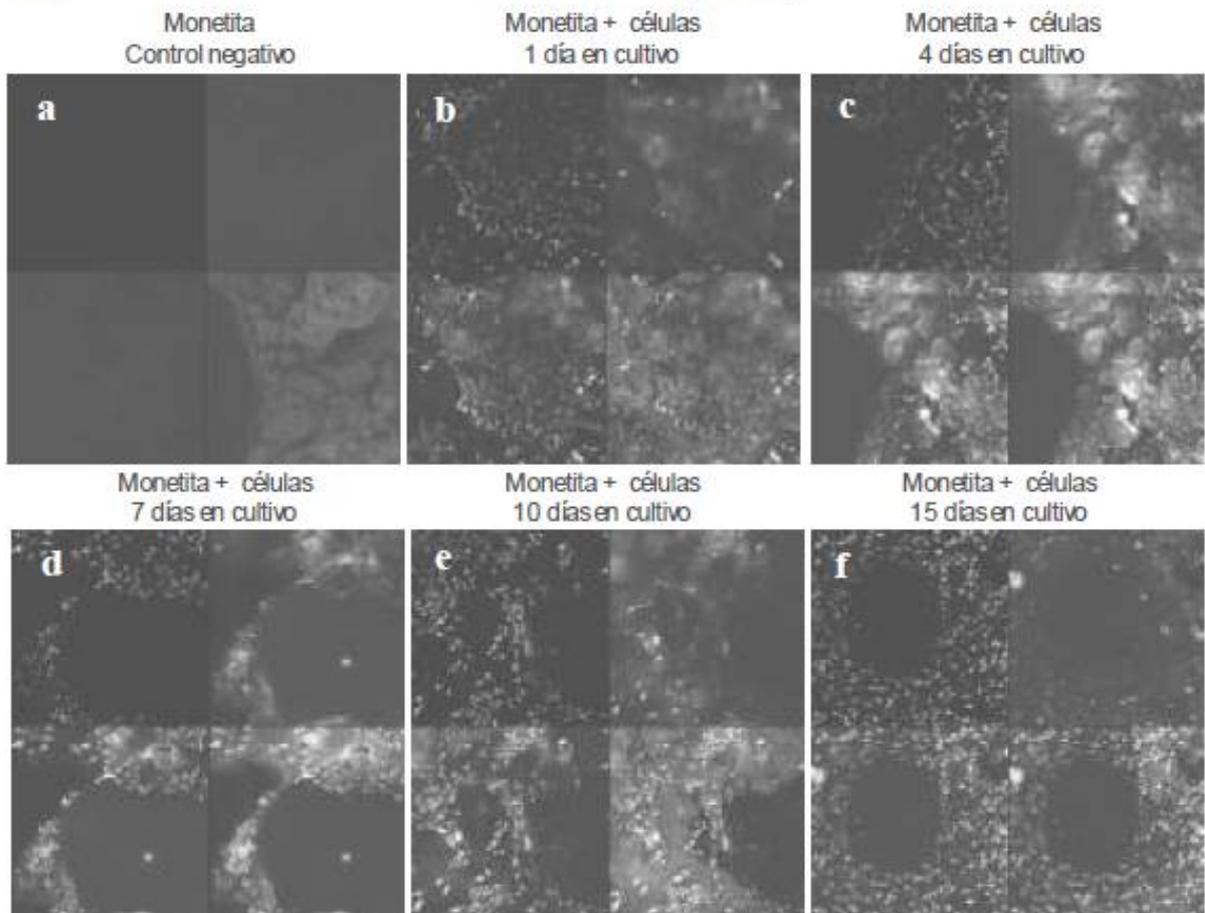


Fig. 26

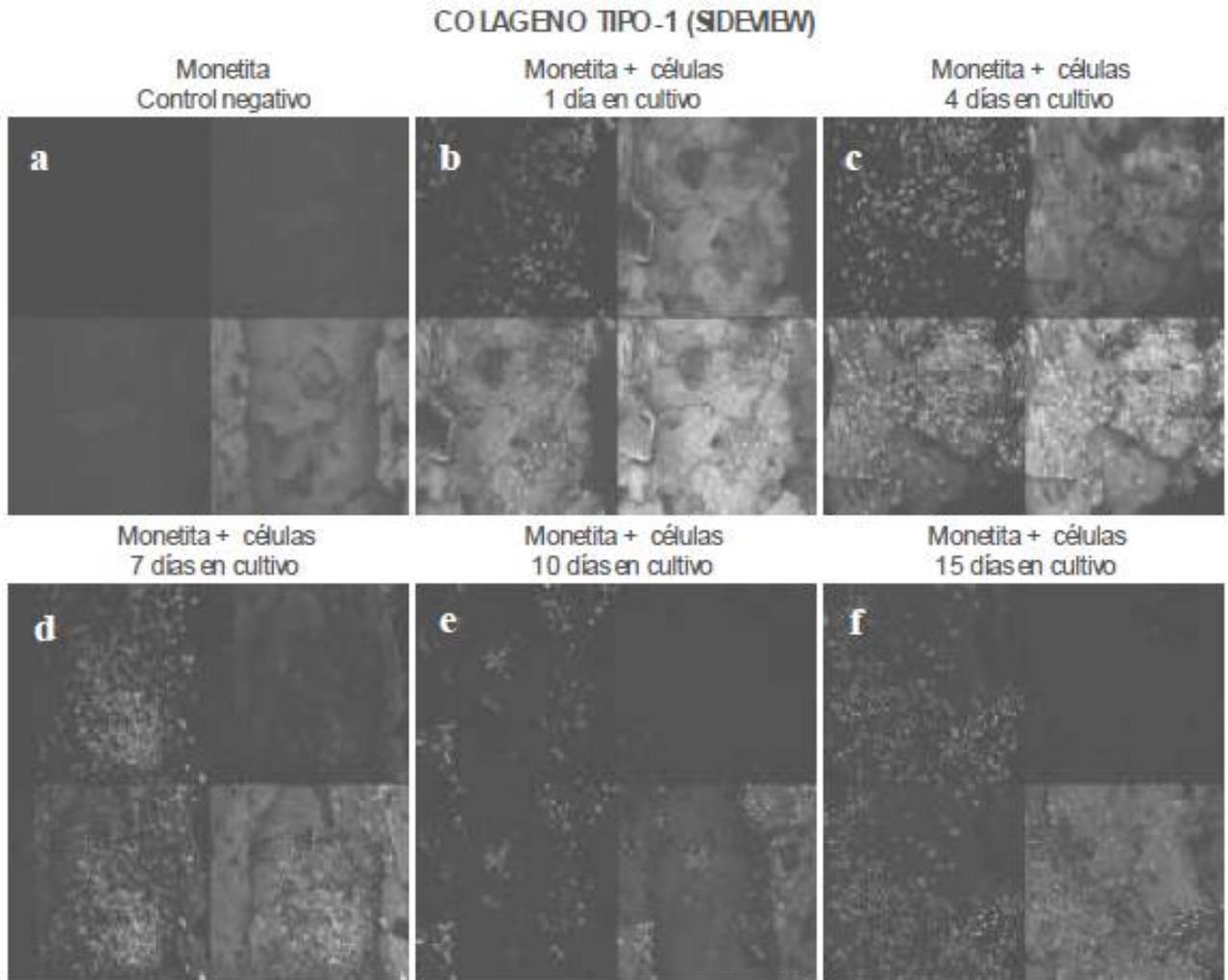


Fig. 27

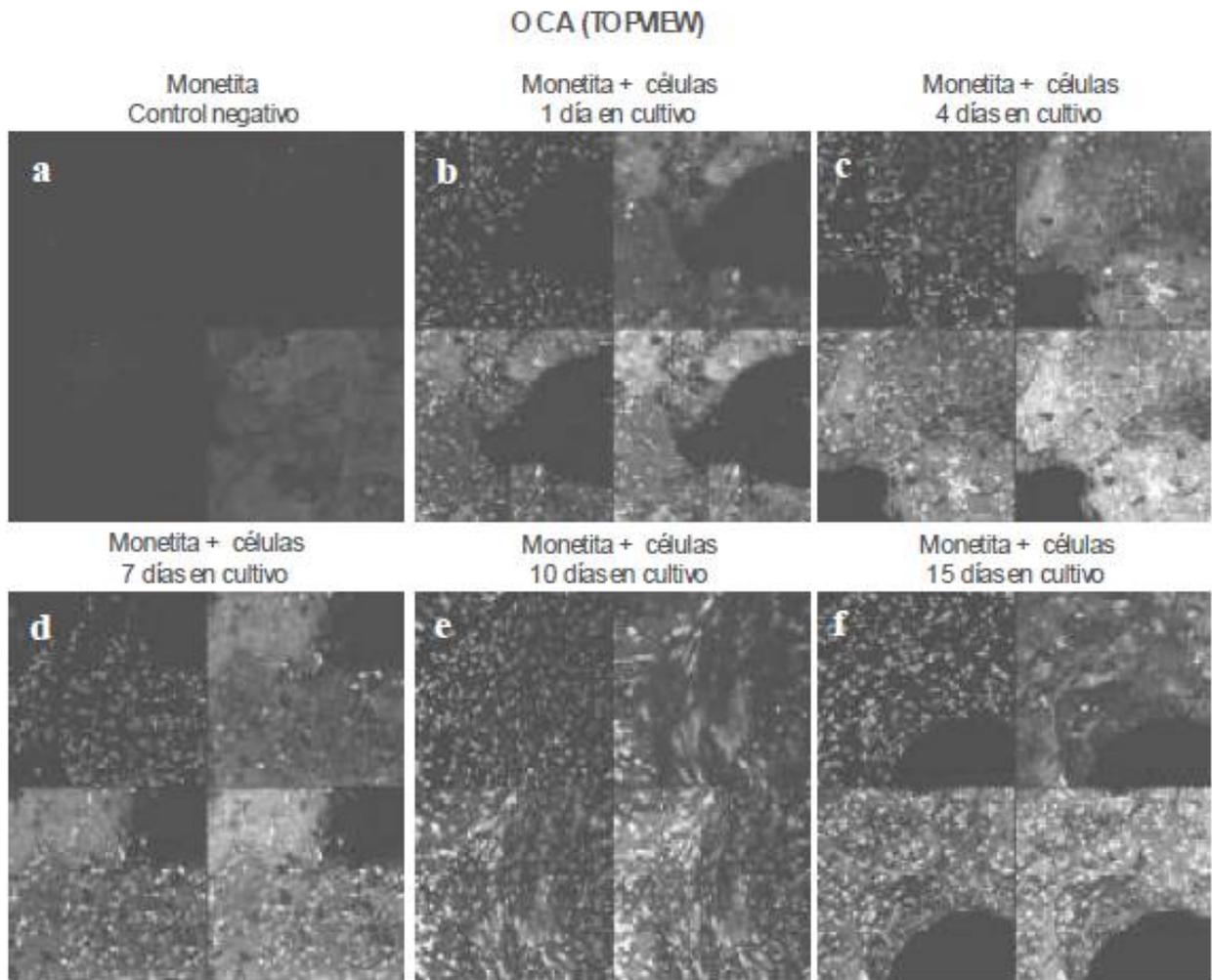


Fig. 28

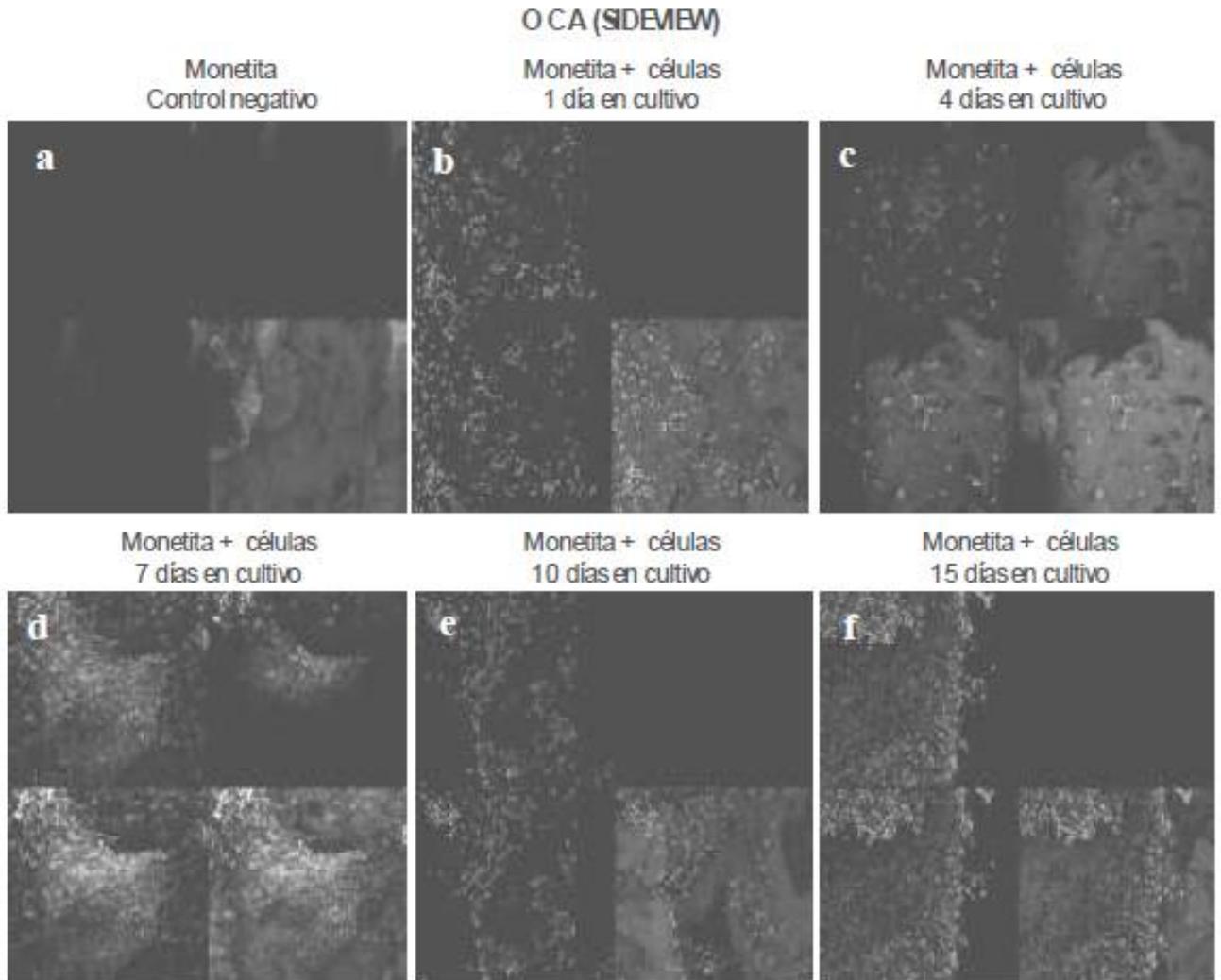


Fig. 29

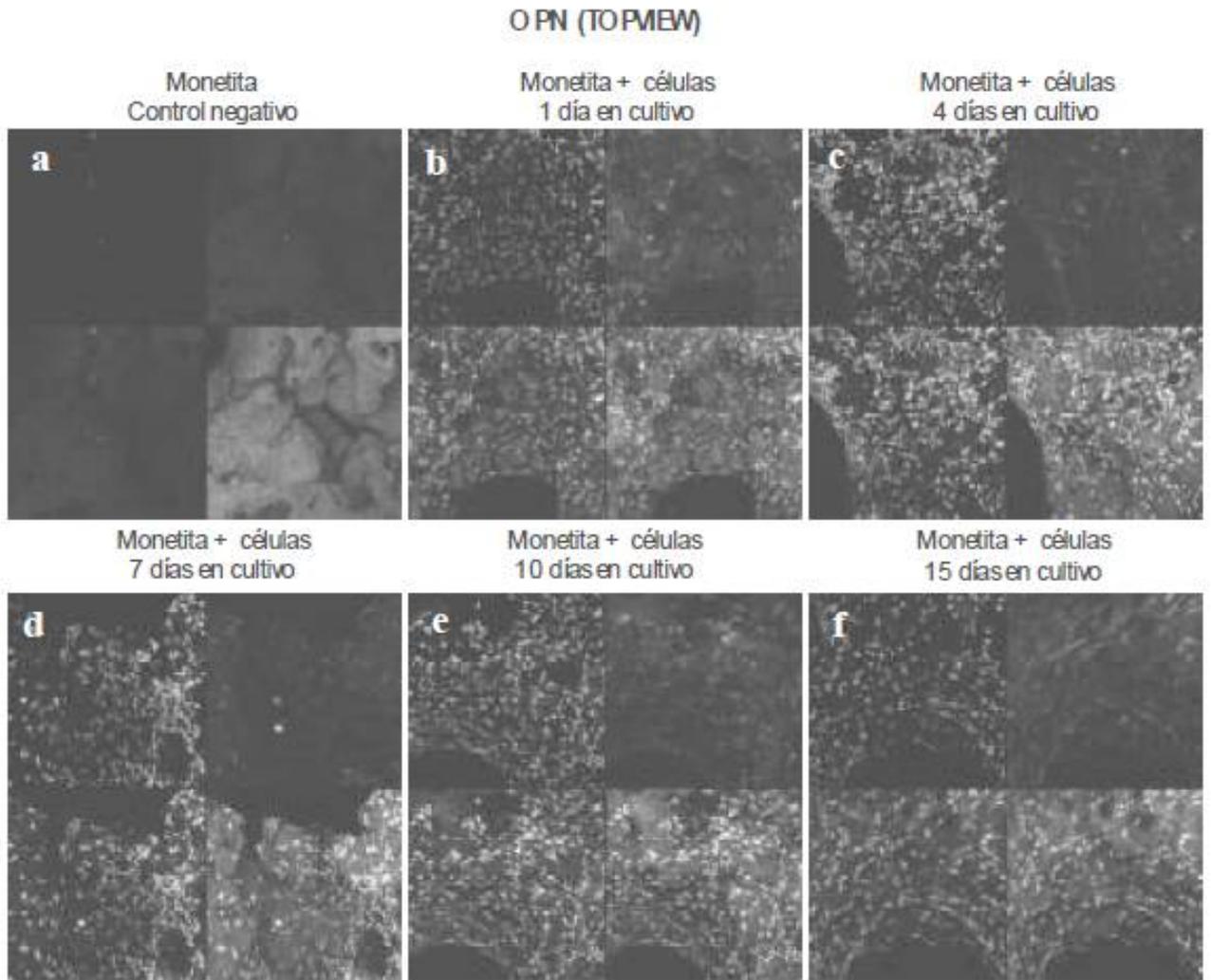


Fig. 30

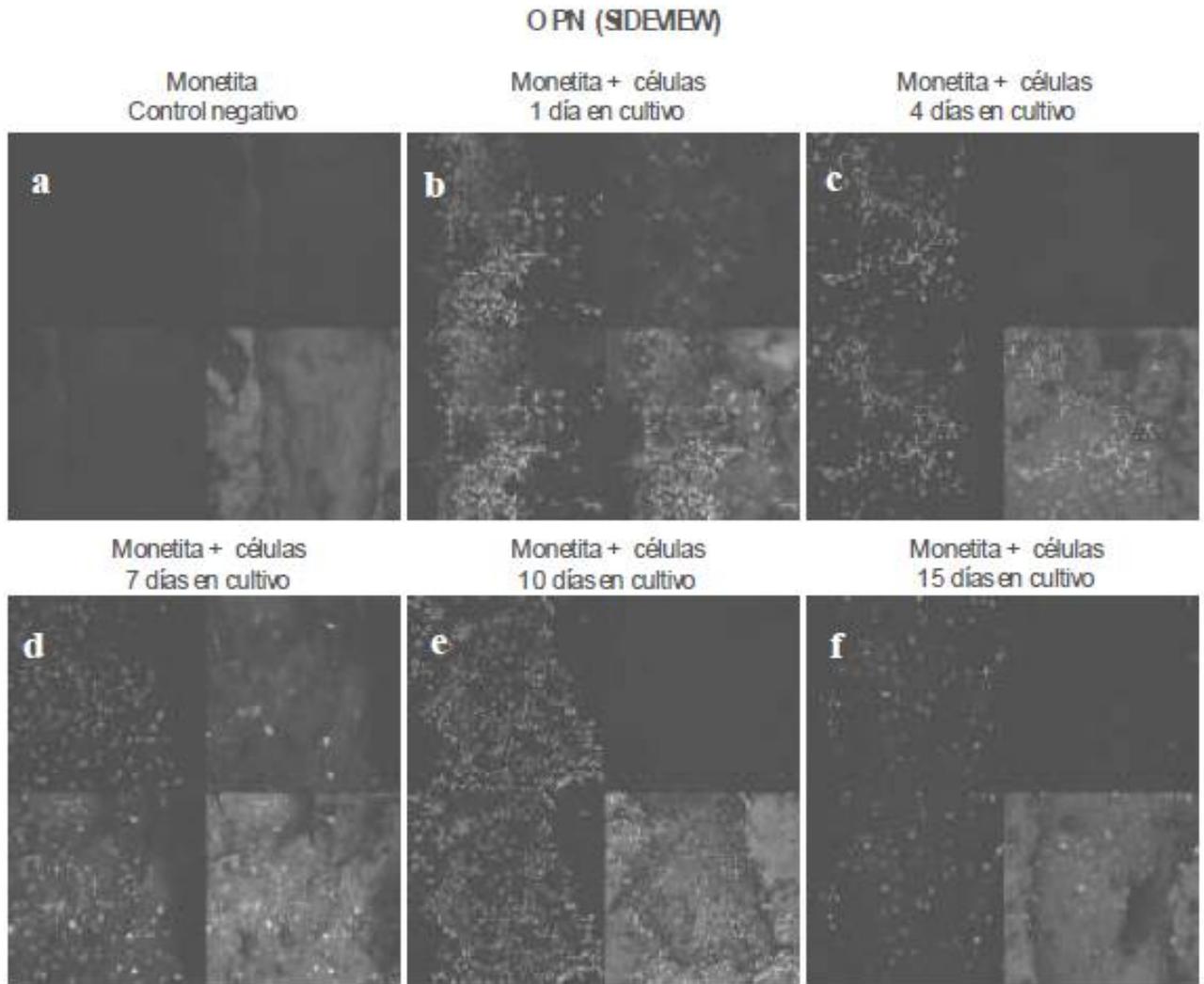
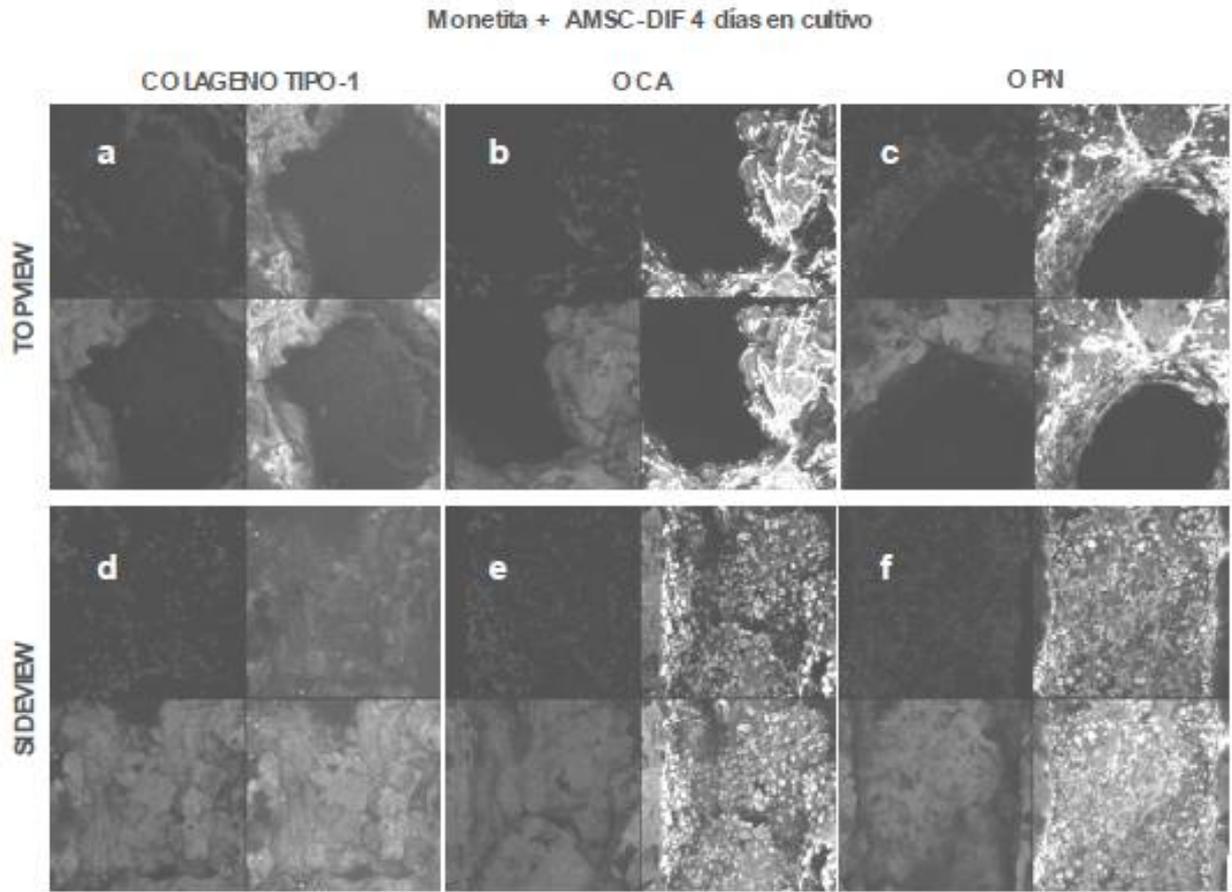


Fig. 31



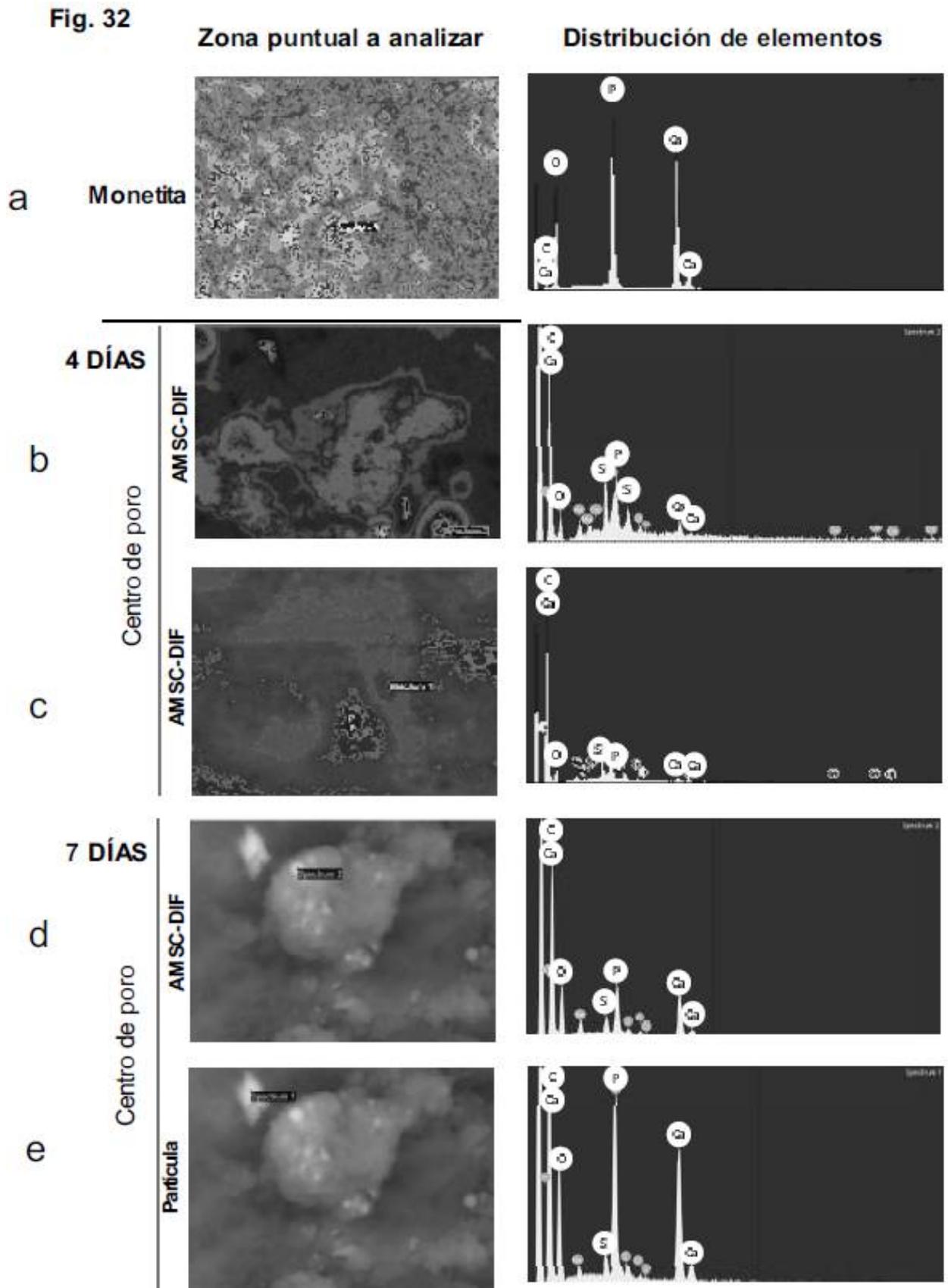


Fig. 33

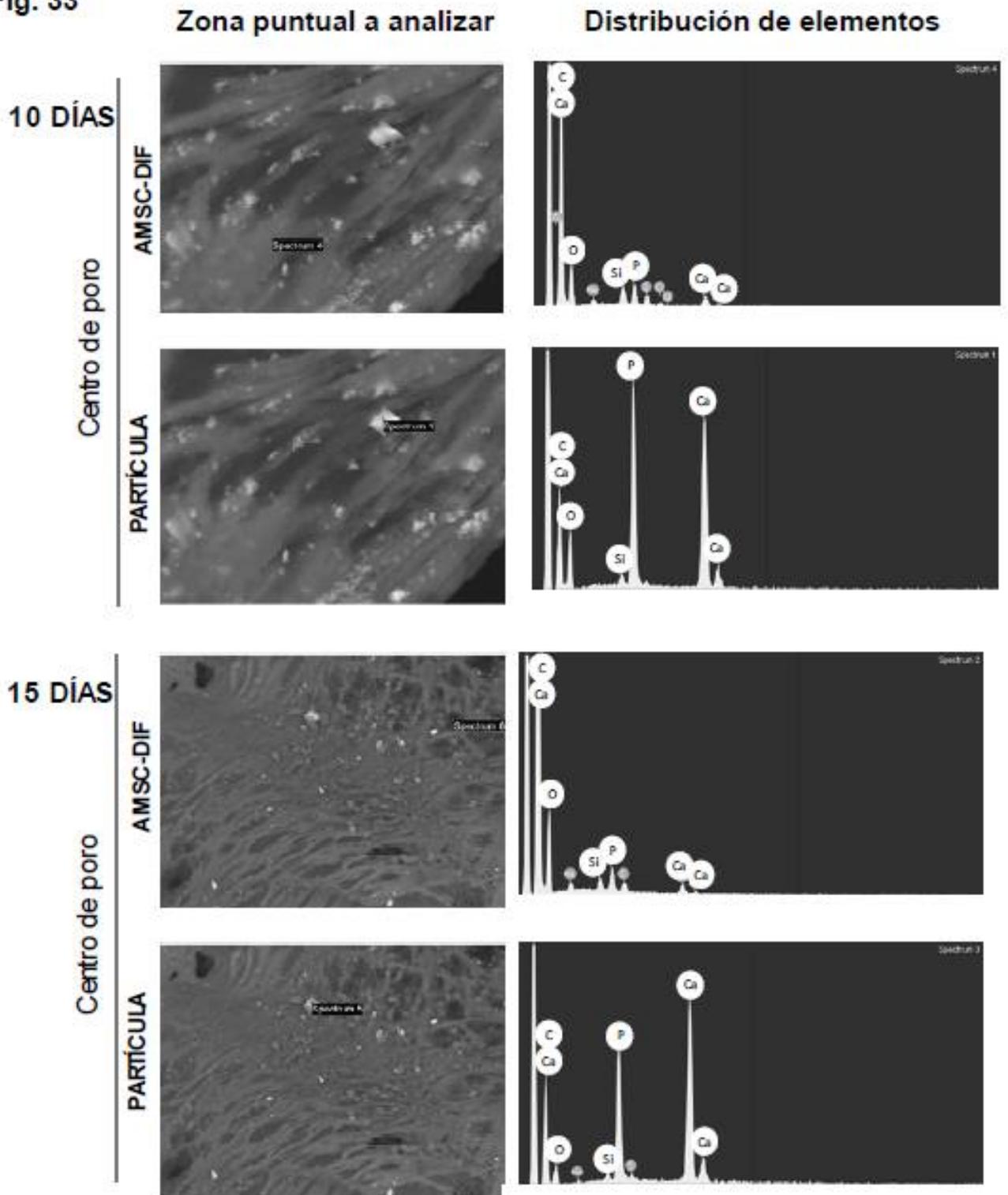


Fig. 34

Distribución de elementos de AMSC-DIF en el centro de uno de los poros de monetita

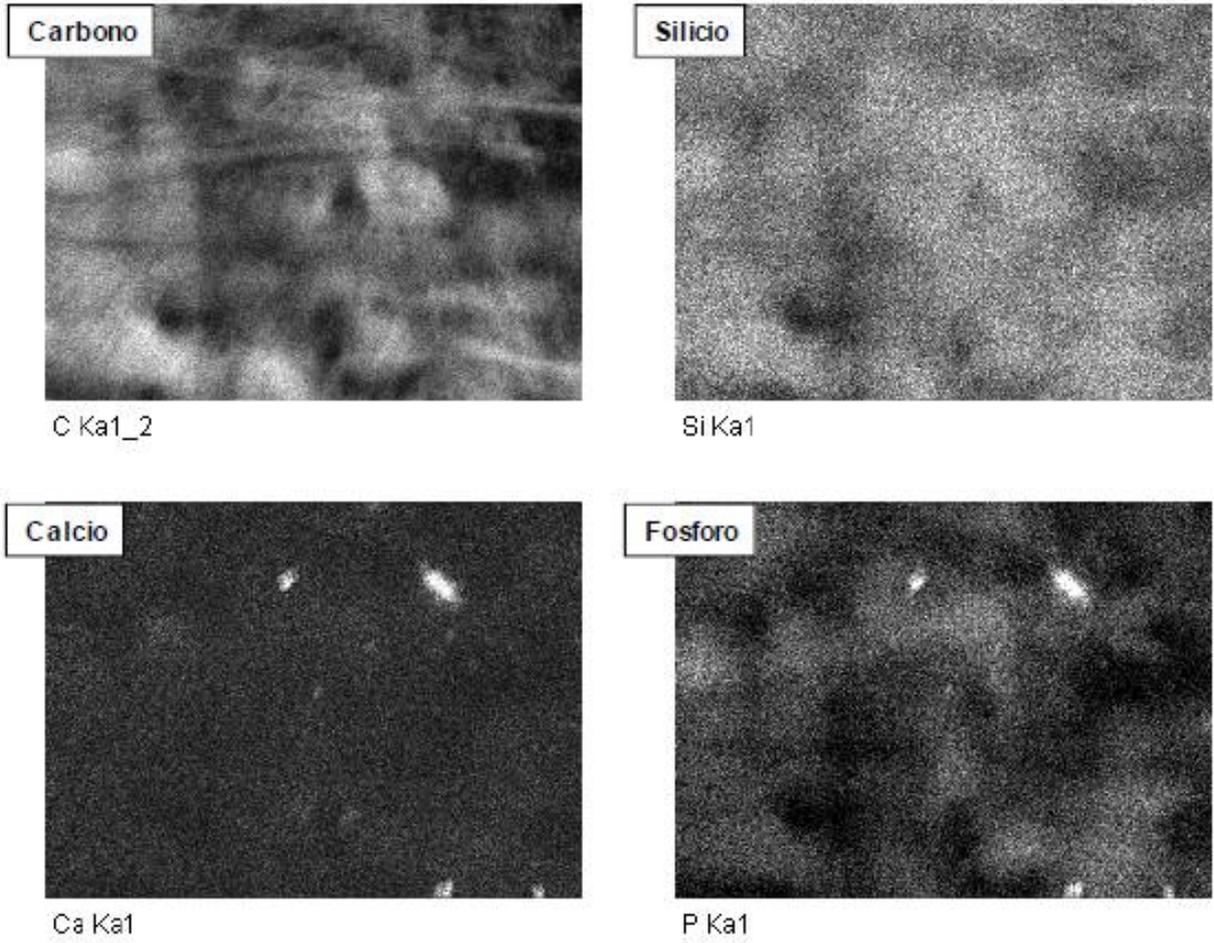
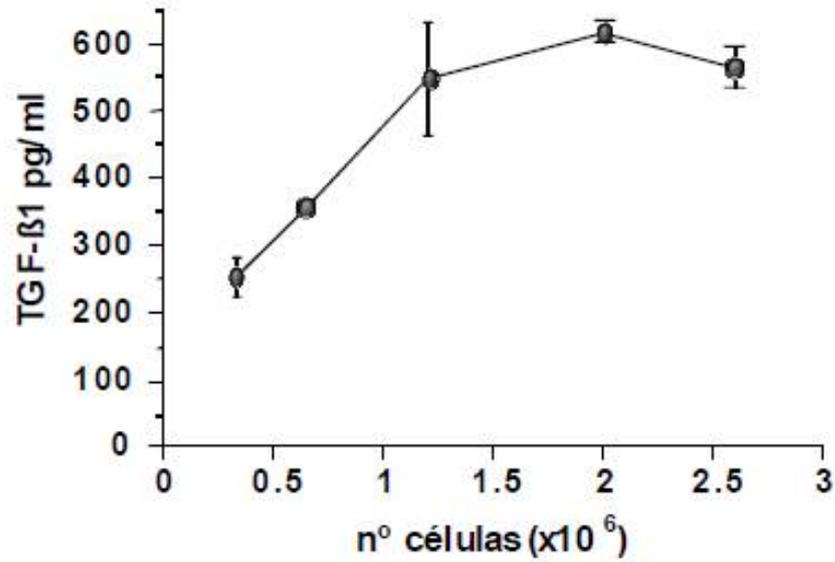
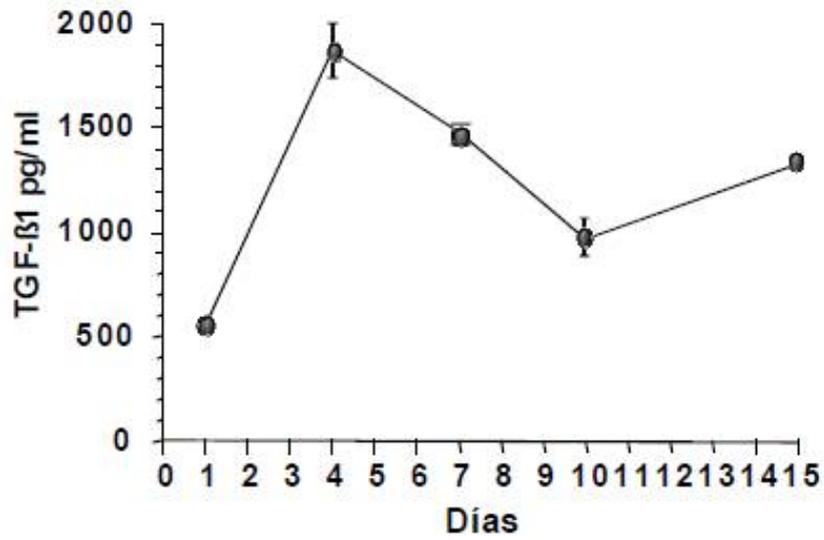


Fig. 35



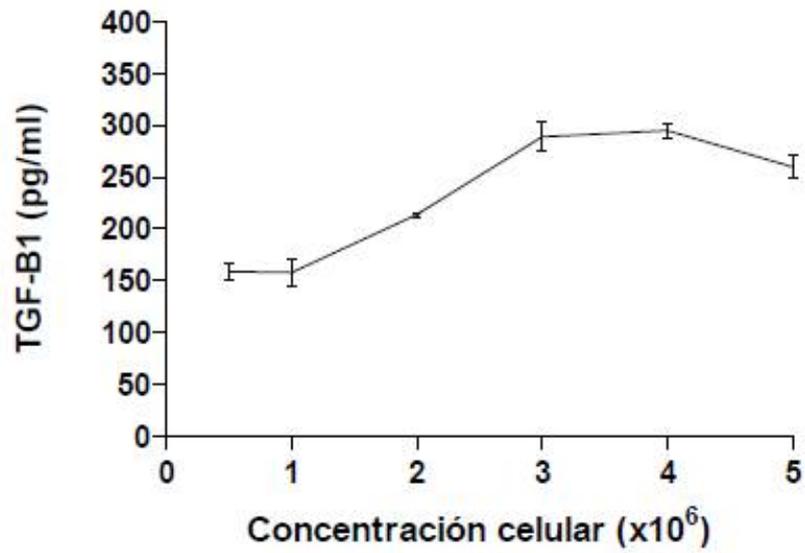
nº células	0.5x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶	4x10 ⁶
TGFβ1(pg/ml)	252±30	355±3	547±85	616±7	563±13

Fig. 36



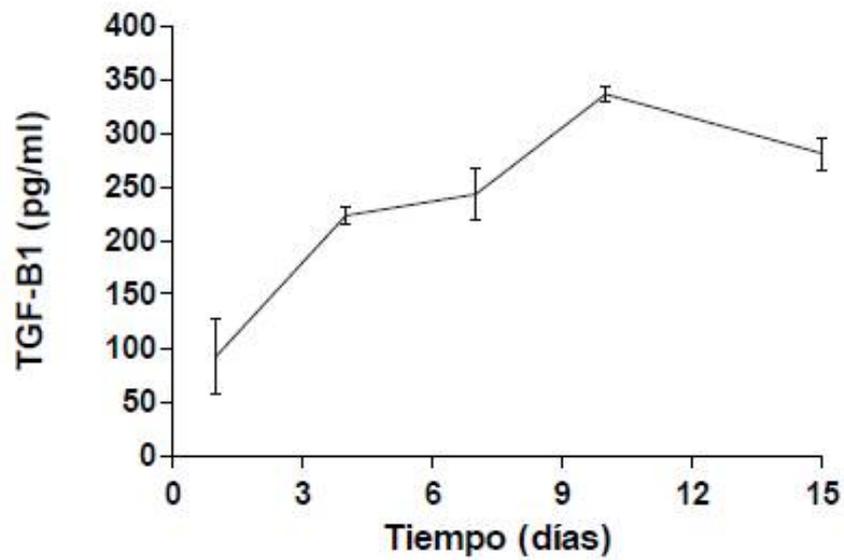
Tiempo en cultivo (días)	1	4	7	10	15
TGFβ1(pg/ml)	550±8	1862±131	1474±31	969±30	1327±15

Fig. 37



n° células	0.5x10 ⁶	1x10 ⁶	2x10 ⁶	3x10 ⁶	4x10 ⁶	5x10 ⁶
TGFB1(pg/ml)	159 \pm 8	158 \pm 14	214 \pm 2	289 \pm 14	295 \pm 7	260 \pm 8

Fig. 38



Tiempo en cultivo (días)	1	4	7	10	15
TGFB1(pg/ml)	92 \pm 35	223 \pm 7	243 \pm 24	336 \pm 7	281 \pm 20