

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 749**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/46** (2006.01)

**A61L 27/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2012 PCT/JP2012/054965**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12118090**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2012 E 12752347 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2682135**

54 Título: **Tejido no tejido que contiene material protésico óseo**

30 Prioridad:

**28.02.2011 JP 2011042450**

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

**28.11.2018**

73 Titular/es:

**SUNSTAR INC. (100.0%)  
3-1 Asahi-machi  
Takatsuki-shi, Osaka 569-1195, JP**

72 Inventor/es:

**OKIMURA, YUSUKE;  
KITA, KAZUYOSHI;  
HANAKI, NAOYUKI y  
NEMOTO, YASUNORI**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 691 749 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Tejido no tejido que contiene material protésico óseo.

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un tejido no tejido que contiene un material protésico óseo.

### 10 **Técnica anterior**

En la actualidad, los "tratamientos de implante" están extendidos universalmente. Los tratamientos de implante designan procedimientos para reparar pérdidas dentales debido al envejecimiento, enfermedades periodontales, o similares, mediante el implante de una raíz dental artificial en un hueso alveolar, y cubriendo la raíz dental implantada con una corona artificial y una superestructura.

15 Cuando se pierde un diente, (es decir, cuando se extrae un diente), el hueso alveolar que ha soportado el diente se absorbe y se reduce inmediatamente. Por tanto, durante los tratamientos de implante, a menudo se encuentra que el hueso alveolar es de grosor insuficiente para la implantación de la raíz dental artificial. El grosor insuficiente del hueso alveolar hará probablemente que el diente artificial implantado sea inestable. Por tanto, cuando el hueso alveolar presenta grosor insuficiente, se realiza injerto óseo o regeneración ósea.

20 El método de GBR (regeneración ósea guiada) es una de las técnicas comunes para la regeneración del hueso alveolar. En el método de GBR, se coloca hueso autógeno pulverizado o un material protésico óseo en la parte (parte afectada) en la que el hueso alveolar está reducido, y se coloca una membrana (también denominada membrana de protección o membrana de GBR) sobre el mismo (es decir, la parte afectada rellena con el material protésico óseo se cubre con la membrana). De este modo, el método de GBR promueve la regeneración del hueso alveolar a la vez que impide la entrada del tejido gingival. Sin embargo, los materiales protésicos óseos existentes son insuficientes en cuanto a la unión celular y la proliferación celular. Por este motivo, la regeneración del hueso alveolar lleva mucho tiempo. Además, puesto que los materiales protésicos óseos existentes presentan adhesividad insuficiente a los huesos alveolares y retención insuficiente en la parte afectada, a menudo se produce fuga del material incluso una vez que el material está cubierto con la membrana de GBR.

25 Además, aunque los tratamientos de implante ocasionalmente utilizan cemento óseo, el cemento óseo presenta un inconveniente porque bloquea la infiltración celular.

30 Tal como se describió anteriormente, los materiales de regeneración ósea disponibles actualmente adolecen de unión celular y proliferación celular insuficientes.

35 Con el fin de resolver tales inconvenientes, se continuó con el estudio y el desarrollo para inventar un material de regeneración ósea adecuado para regeneración ósea (en particular, de hueso alveolar) (por ejemplo, véanse los documentos de patente 1, 2 y 3). El documento de patente 3 da a conocer un andamiaje poroso para regeneración ósea, que comprende fibras electrohiladas y una pluralidad de partículas que presentan un diámetro de 1 a 8 micrómetros. El andamiaje presenta una porosidad de aproximadamente el 90% y las partículas se pulverizan sobre el andamiaje durante el electrohilado.

### 40 **Listado de referencias**

[Documento de patente 1] WO2007/132186  
 [Documento de patente 2] JP2007-32554 3A  
 [Documento de patente 3] WO2008/093341

### 45 **Sumario de la invención**

#### 50 Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un material de regeneración ósea adecuado para regeneración ósea (en particular, de hueso alveolar).

#### 55 Solución al problema

60 Sorprendentemente, los inventores de la presente invención encontraron que un tejido no tejido que contiene un material protésico óseo en el que el material protésico óseo está incluido entre las fibras, que son fibras biocompatibles, puede servir como material de regeneración ósea que garantiza eficacia de proliferación celular significativamente alta (en particular, de osteoblastos) (alta capacidad de proliferación celular). Los inventores realizaron intentos para mejorar adicionalmente este tejido no tejido, y finalmente completaron la presente invención, tal como se define por las reivindicaciones.

Efectos ventajosos de la invención

5 Cuando el tejido no tejido que contiene un material protésico óseo de la presente invención se utiliza como andamiaje de cultivo celular, la eficacia de proliferación celular (en particular, de osteoblastos) aumenta significativamente (es decir, aumenta la capacidad de proliferación celular). Además, en particular, cuando el tejido no tejido se utiliza como andamiaje para el cultivo de osteoblastos, proporciona el efecto de un aumento en la eficacia de regeneración ósea, puesto que el tejido no tejido contiene un material protésico óseo. Por tanto, el tejido no tejido puede utilizarse adecuadamente como material de regeneración ósea. Más específicamente, en casos de  
10 daño óseo debido a factores externos (por ejemplo, accidente), o en casos de absorción o pérdida de hueso debido a factores internos (por ejemplo, osteoporosis, periodontitis, etc.), el tejido no tejido de la presente invención permite la regeneración ósea rápida (específicamente, al implantarse en o unirse a la parte afectada).

**Breve descripción de los dibujos**

15 [Figura 1] Vista esquemática sencilla que representa un procedimiento de producción de tejido no tejido utilizando un método de electrohilado.

20 [Figura 2] Imágenes que representan un ejemplo de un electrodo de masa utilizado para la producción del tejido no tejido de la presente invención.

[Figura 3] Vistas en sección transversal que representa el tejido no tejido de la presente invención (y un tejido no tejido general producido mediante un método de electrohilado).

25 [Figura 4] Imágenes (tomadas mediante un microscopio electrónico de barrido) de secciones transversales del tejido no tejido de la presente invención.

[Figura 5] Gráfico que presenta las capacidades de proliferación celular de las muestras 1 a 3 del tejido no tejido de la presente invención.

30 [Figura 6a] Imagen de un fragmento tisular para mostrar el nivel de infiltración de un tejido conjuntivo en un material protésico óseo en forma de bloque cuando el material protésico óseo en forma de bloque (bloque de OSferion) se implanta en una rata. La línea discontinua exterior muestra el contorno del material protésico óseo implantado, y la línea de puntos interior muestra el extremo superior del tejido infiltrado en el material protésico óseo.

40 [Figura 6b] Imagen de un fragmento tisular para mostrar el nivel de infiltración de un tejido conjuntivo en un tejido no tejido cuando el tejido no tejido de la presente invención se implanta en una rata. La línea discontinua exterior muestra el contorno del tejido no tejido implantado, y la línea de puntos interior muestra el extremo superior del tejido infiltrado en el tejido no tejido.

[Figura 7] Imágenes de células teñidas con HE tras realizar cultivos celulares utilizando diferentes tipos de tejido no tejido como andamiaje; y distancias de infiltración celular encontradas a partir de las imágenes.

45 [Figura 8] Resultados de la medición del tamaño de poro de materiales textiles no tejidos; e imágenes de células teñidas con HE tras realizar cultivos celulares utilizando los materiales textiles no tejidos como andamiaje.

[Figura 9] Dibujos que representan esquemáticamente un método de medición para determinar la distancia entre fibras (distancia interfibra).

50 [Figura 10] Resultados de la medición del tamaño de poro de materiales textiles no tejidos; imágenes de células teñidas con HE tras realizar cultivos celulares utilizando los materiales textiles no tejidos como andamiaje; y distancias de infiltración celular encontradas a partir de las imágenes.

**Mejor modo de poner en práctica la invención**

La presente invención se describe con mayor detalle a continuación. El término "masa" en la presente memoria es equivalente a "peso".

60 La presente invención se refiere a un tejido no tejido que contiene un material protésico óseo. En el tejido no tejido, el material protésico óseo está incluido entre fibras que constituyen el tejido no tejido. Además, estas fibras son fibras biocompatibles.

65 El material protésico óseo contenido en el tejido no tejido puede seleccionarse de materiales conocidos, incluyendo  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -fosfato de tricalcio),  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -fosfato de tricalcio), HA (hidroxiapatita), DCPD (fosfato de calcio dibásico dihidratado), OCP (fosfato de octacalcio), 4CP (fosfato de tetracalcio), alúmina, circonita, aluminato de calcio (CaO-

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), aluminosilicato (Na<sub>2</sub>O-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>), vidrio bioactivo, cuarzo y carbonato de calcio. Más específicamente, pueden utilizarse fragmentos que contienen estos componentes (preferentemente, fragmentos de estos componentes). El material protésico óseo puede estar compuesto por uno de estos componentes, o una combinación de dos o más componentes. Los materiales protésicos óseos compuestos por una combinación de dos o más componentes incluyen materiales compuestos por un fragmento o fragmentos, cada uno de los cuales contiene dos o más componentes; o materiales compuestos por múltiples fragmentos, cada uno de los cuales presenta un solo componente.

Además, cada fragmento del material protésico óseo presenta un tamaño que puede incluirse en un tejido no tejido o más pequeño. Cada fragmento puede presentar una forma arbitraria, tal como una partícula, una forma de bloque, una forma de cilindro, y similares.

El diámetro de partícula de cada fragmento del material protésico óseo es preferentemente menor que el grosor del tejido no tejido. El tamaño de partícula es de 50 a 5000 µm, de manera adicionalmente preferible de 75 a 5000 µm, de manera adicionalmente más preferible de 150 a 3000 µm, de manera particularmente preferible de 500 a 1500 µm. Este diámetro de partícula es un valor encontrado mediante un método de tamizado en seco. Más específicamente, el tamaño de partícula es un valor encontrado utilizando un agitador Ro-Tap (de rotación y percusión) que contiene un tamiz según la regla JIS Z8801. Un material protésico óseo que presenta el diámetro de partícula específico puede obtenerse a través de un método de tamizado en seco. Además, el diámetro de partícula de un material protésico óseo con diámetro de partícula desconocido también puede encontrarse mediante un método de tamizado en seco. La expresión "diámetro de partícula" en la presente memoria no es para especificar que el material protésico óseo se limita a una forma en polvo, sino sólo para definir el intervalo de tamaño anterior. El valor de "diámetro de partícula" definido en la presente memoria también puede encontrarse para un material protésico óseo que presenta otras formas (por ejemplo, una forma de bloque, una forma de cilindro, o similares).

El tejido no tejido de la presente invención también puede seleccionarse de entre materiales protésicos óseos disponibles comercialmente. Los ejemplos de los mismos incluyen OSferion (Olympus Terumo Biomaterials Corp.), Boneceram (Olympus Terumo Biomaterials Corp.), Neobone (MMT Co., Ltd.), Osteograft-S (Japan Medical Materials) y Apaceram (Pentax Corporation).

En el tejido no tejido de la presente invención, el material protésico óseo existe entre múltiples (un gran número de) fibras del tejido no tejido. Más específicamente, el material protésico óseo no se incorpora dentro de una sola fibra, sino que se incorpora entre las fibras que constituyen el tejido no tejido. En otras palabras, las fibras del tejido no tejido están presentes con el material protésico óseo enmarañado entre ellas. Las fibras del tejido no tejido de la presente invención son fibras biocompatibles que contienen un polímero biocompatible. Las fibras biocompatibles son preferentemente biodegradables en un organismo vivo. La cantidad del polímero biocompatible contenido en las fibras generalmente es de más del 50% en masa, preferentemente no menos del 75% en masa, más preferentemente no menos del 80% en masa, de manera adicionalmente preferible no menos del 85% en masa, de manera adicionalmente más preferible no menos del 90% en masa, de manera particularmente preferible no menos del 95% en masa, de la manera más preferible sustancialmente del 100% (es decir, una fibra biocompatible compuesta sólo por un polímero biocompatible es lo más preferible).

Un polímero biocompatible designa un polímero que provoca poca o ninguna respuesta de cuerpo extraño cuando se adhiere a o se incluye en un tejido vivo (en otras palabras, un polímero que no provoca ningún efecto adverso o estimulación grave en un organismo vivo durante un largo periodo de tiempo; es decir, puede coexistir con tejidos vivos a la vez que garantiza la función original). Los ejemplos de tales polímeros biocompatibles incluyen polímeros bioabsorbibles y polímeros biodegradables.

Los ejemplos específicos de polímeros biocompatibles incluyen poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímero de poli(ácido láctico)-poli(ácido glicólico), policaprolactona, poli(succinato de butileno), poli(succinato de etileno), poliestireno, policarbonato, poli(carbonato de hexametileno), poliariolato, poli(isocianato de vinilo), poli(isocianato de butilo), poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de n-propilo), poli(metacrilato de n-butilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de etilo), poli(acrilato de butilo), poli(acrilonitrilo), poli(acetato de vinilo), polivinil metil éter, polivinil etil éter, polivinil-n-propil éter, polivinilisopropil éter, polivinil-n-butil éter, polivinilisobutil éter, polivinil-terc-butil éter, poli(cloruro de vinilo), cloruro de polivinilideno, poli(N-vinilpirrolidona), poli(N-vinilcarbazol), poli(4-vinilpiridina), polivinilmetil cetona, polimetil isopropenil cetona, óxido de polietileno, óxido de polipropileno, óxido de policiclopenteno, poliestirenosulfona, Teflon<sup>®</sup> (politetrafluoroetileno), policianoacrilato, poliéter éter cetona, poliuretano, poliiimida, poli(cloruro de vinilo), polietileno (incluyendo polietileno de peso molecular súper alto), polipropileno, poli(tereftalato de etileno), poli(fluoruro de vinilideno) (poli(difluoruro de vinilideno)), polisulfona, poliéter sulfona; y copolímeros de los mismos y polímeros sintéticos similares, celulosa regenerada, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa, metilcelulosa, propilcelulosa, bencilcelulosa, fibroína, caucho natural y biomacromoléculas similares y derivados de los mismos. Los ejemplos también incluyen quitina, gelatina, colágeno, poliaminoácidos (polilisina, poliarginina), ácido hialurónico, sericina, dextrano y pululano.

Entre ellos, los polímeros biocompatibles preferidos incluyen poliésteres alifáticos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímero de poli(ácido láctico)-poli(ácido glicólico), polihidroxibutirato, policaprolactona,

poli(adipato de etileno), poli(adipato de butileno), poli(succinato de butileno), poli(succinato de etileno) y policianoacrilato, o copolímeros de los mismos; y policarbonatos alifáticos tales como poli(carbonato de butileno) o poli(carbonato de etileno). Ejemplos preferibles adicionales incluyen poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímero de poli(ácido láctico)-poli(ácido glicólico) y policaprolactona. Entre ellos, es particularmente preferible poli(ácido láctico). Estos polímeros biocompatibles pueden utilizarse de manera individual, o en una combinación de dos o más.

En tanto que los efectos de la presente invención no resulten afectados, pueden utilizarse otros polímeros o compuestos (por ejemplo, copolímeros de polímeros, combinaciones de polímeros, fosfolípidos, otros compuestos, y mezclas de los mismos).

El diámetro de fibra promedio de las fibras del tejido no tejido es preferentemente de aproximadamente 0,05 a 20  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 5  $\mu\text{m}$ , de manera adicionalmente preferible de aproximadamente 0,1 a 3  $\mu\text{m}$ . Este intervalo de diámetro de fibra promedio permite la fácil adhesión de osteoblastos, y también es ventajoso en lo que se refiere a mejorar la eficacia de regeneración ósea. El diámetro de fibra promedio es un valor encontrado midiendo el diámetro de cada fibra en una imagen de microscopio electrónico del tejido no tejido, y encontrando un diámetro promedio de 50 fibras seleccionadas aleatoriamente.

Un grosor adecuado del tejido no tejido puede determinarse según la parte afectada (el sitio de defecto óseo en el que se aplica el tejido no tejido). El grosor es preferentemente de aproximadamente 0,1 a 5 cm, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 1 cm, de manera adicionalmente preferible de aproximadamente 0,1 a 0,5 cm. El "grosor" del tejido no tejido en la presente memoria designa una longitud del tejido no tejido en la dirección del grosor medida sin aplicar presión. El grosor puede medirse utilizando un calibre de grosor (calibre de grosor digital, Ozaki Co., Ltd., DG-205M), y similares.

La densidad aparente ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ), es decir, {peso de tejido no tejido (g)/volumen de tejido no tejido ( $\text{cm}^3$ )} del tejido no tejido de la presente invención es preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,6, más preferentemente de aproximadamente 0,1 a 0,5, de manera adicionalmente preferible de aproximadamente 0,1 a 0,4, de manera adicionalmente más preferible de aproximadamente 0,1 a 0,3, aún más preferentemente de aproximadamente 0,15 a 0,25, de manera particularmente preferible de aproximadamente 0,15 a 0,2. Si el material protésico óseo contenido en el tejido no tejido es  $\beta$ -TCP o  $\alpha$ -TCP, es particularmente preferible que la densidad aparente se encuentre dentro del intervalo anterior. El volumen ( $\text{cm}^3$ ) del tejido no tejido se encuentra en este caso cortando el tejido no tejido para dar un rectángulo (de aproximadamente 4  $\text{cm}^2$ ), midiendo la longitud vertical, la longitud horizontal y el grosor del rectángulo utilizando un calibre de grosor; y multiplicando la longitud vertical, la longitud horizontal y el grosor.

La porosidad del tejido no tejido de la presente invención es del 80 al 97%, del 85 al 97%, del 90 al 97%, del 90 al 95%, del 91 al 95%, del 91,5 al 95% y del 92 al 95%, en este orden. La porosidad (%) puede encontrarse a partir de la densidad (densidad real) de las fibras del tejido no tejido y la densidad del material protésico óseo. Más específicamente, los volúmenes de las fibras y el material protésico óseo pueden encontrarse dividiendo el peso de las fibras contenidas en una parte de 1  $\text{cm}^3$  del tejido no tejido de la presente invención y el peso del material protésico óseo entre sus densidades reales. Por consiguiente, restando el valor total de los volúmenes de 1 ( $\text{cm}^3$ ) y multiplicando el valor resultante por 100, puede encontrarse la porosidad (%) del tejido no tejido. La siguiente fórmula muestra este cálculo.

[Mat. 1]

$$\text{porosidad del tejido no tejido (\%)} = [1 - \{(\text{peso de fibra}/\text{densidad real de fibra}) + (\text{peso de material protésico óseo}/\text{densidad real de material protésico óseo})\}] \times 100$$

La porosidad (%) de la parte de fibras del tejido no tejido también puede encontrarse dividiendo el volumen ( $\text{cm}^3$ ) de las fibras entre un valor obtenido restando el volumen ( $\text{cm}^3$ ) del material protésico óseo de 1 ( $\text{cm}^3$ ), y multiplicando el resultado del cálculo por 100. La siguiente fórmula muestra este cálculo.

[Mat. 2]

$$\text{porosidad de las fibras del tejido no tejido (\%)} = [1 - \{(\text{peso de fibra}/\text{densidad real de fibra}) / \{1 - (\text{peso de material protésico óseo}/\text{densidad real de material protésico óseo})\}\}] \times 100$$

La porosidad de las fibras del tejido no tejido es preferentemente de aproximadamente el 85 al 99,99%, más preferentemente de aproximadamente el 90 al 99,99%, incluso más preferentemente de aproximadamente el 97,5 al 99,99%, de manera adicionalmente preferible de aproximadamente el 98 al 99,8%.

La densidad real en la presente memoria descriptiva se encuentra según el método de expansión a volumen constante. La medición de la densidad real puede realizarse, por ejemplo, utilizando un picnómetro automático en seco (AccuPyc 1330; Shimadzu Corporation).

La porosidad del tejido no tejido y la porosidad de las fibras del tejido no tejido que se encuentran dentro del intervalo anterior facilitan particularmente la infiltración celular; y también mejoran la permeabilidad de la sangre y los líquidos corporales, y permite la fácil invasión de nuevos vasos sanguíneos tras la regeneración tisular. En la presente invención, la porosidad de las fibras del tejido no tejido de la presente invención es mayor que la de un tejido no tejido general. Aunque no se desea una interpretación restrictiva, se supone que la incorporación de un material protésico óseo entre fibras aumenta la porosidad. Pese a la alta porosidad entre las fibras, cuando se aplica una presión sobre el tejido no tejido de la presente invención, el grosor del tejido no tejido se recupera en cierta medida al liberar la presión (por ejemplo, cuando se presiona el tejido no tejido con una mano, el grosor se recuperará en cierta medida al retirar la mano). También se supone que esto se deriva de la incorporación de un material protésico óseo entre las fibras.

El tamaño de poro del tejido no tejido de la presente invención es preferentemente de aproximadamente 0,5 a 500  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de aproximadamente 1 a 100  $\mu\text{m}$ , de manera adicionalmente preferible de aproximadamente 2 a 50  $\mu\text{m}$ , de manera adicionalmente más preferible de aproximadamente 3 a 30  $\mu\text{m}$ , de manera particularmente preferible de aproximadamente 6 a 20  $\mu\text{m}$ .

El tamaño de poro del tejido no tejido en esta memoria descriptiva designa el valor de modo de una muestra de medición obtenida despegando la capa de superficie del tejido no tejido de la presente invención. El valor de modo se encuentra según el método de semisecado (regla ASTM E1294-89) utilizando un perfluoropoliéster (intervalo de clase = 1  $\mu\text{m}$ ). La medición del tamaño de poro puede realizarse utilizando un porómetro de flujo de capilaridad (CFP-1200-AEL, Porous Materials, Inc.).

Además, el tejido no tejido de la presente invención presenta una parte de fibras gruesas y una parte de fibras densas (más específicamente, la distribución de fibras presenta densidad variable). La distancia interfibra de la parte de fibras densas es preferentemente de aproximadamente 5 a 40  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de aproximadamente 10 a 30  $\mu\text{m}$ , de manera adicionalmente preferible de aproximadamente 15 a 25  $\mu\text{m}$ . La distancia interfibra de la parte de fibras gruesas es preferentemente de aproximadamente 50 a 100  $\mu\text{m}$ . La distancia interfibra del tejido no tejido en esta memoria descriptiva designa un valor encontrado detectando fibras a partir de una imagen de un bloque congelado de tejido no tejido obtenida mediante un microscopio, y encontrando la distancia utilizando los datos de fibras detectados según el método del centroide.

La proporción del material protésico óseo en el tejido no tejido de la presente invención es preferentemente de aproximadamente el 10 al 98%, más preferentemente de aproximadamente el 50 al 98%, de manera adicionalmente preferible de aproximadamente el 80 al 98%.

La proporción del material protésico óseo en esta memoria descriptiva designa un valor encontrado mediante la siguiente fórmula.

$$\{\text{material protésico óseo contenido en el tejido no tejido(g)/tejido no tejido (g)}\} \times 100(\%)$$

La cantidad (g) del material protésico óseo en el tejido no tejido se encuentra midiendo el peso del residuo una vez que se disuelve el poli(ácido láctico) en el tejido no tejido de la presente invención mediante diclorometano (más específicamente, una vez que se disuelve la parte de fibras del tejido no tejido).

El tejido no tejido de la presente invención puede producirse mediante un método de electrohilado. El electrohilado es un método bien conocido para producir tejido no tejido. Más específicamente, los métodos de electrohilado se realizan descargando una disolución, que se obtiene disolviendo un polímero (y, según sea necesario, un adyuvante de dispersión) en un disolvente volátil (por ejemplo, cloroformo, diclorometano, alcohol hexafluoroisopropílico, o una disolución mixta de los mismos) en un campo electrostático formado entre los electrodos, y formando hebras de la disolución hacia el electrodo (electrodo de masa), produciendo de ese modo una sustancia similar a una fibra. La figura 1 muestra una vista esquemática sencilla de un método de electrohilado. El método mostrado en la figura 1 es sólo un ejemplo de un método de electrohilado, y puede utilizarse cualquier método de electrohilado conocido que pueda producir el tejido no tejido de la presente invención para la producción del tejido no tejido de la presente invención. La figura 1 se describe brevemente a continuación. Mediante la aplicación de una alta tensión a una disolución disuelta de polímero en una jeringa (que presenta una boquilla en el extremo superior), se descarga la disolución de polímero como una gota cónica definida. Además, aumentando adicionalmente la tensión, se expulsa (pulveriza) la disolución hacia el electrodo de masa (por ejemplo, cobre, aluminio, etc.), formando de ese modo una fibra fina (es decir, tejido no tejido) sobre el electrodo de masa. Por tanto, en el método de la figura 1, el electrodo de masa también sirve como colector.

En la presente invención, la concentración del polímero biocompatible en la disolución disuelta de polímero biocompatible utilizada para el método de electrohilado puede determinarse de manera adecuada; la concentración es en general de aproximadamente el 1 al 30% en masa, preferentemente de aproximadamente el 2 al 25% en masa, más preferentemente de aproximadamente el 3 al 20% en masa.

Además, la distancia entre los electrodos (en la figura 1, la distancia entre la jeringa y el electrodo de masa) depende generalmente de la cantidad de carga, el tamaño de la boquilla, la cantidad de flujo de líquido durante el hilado, la concentración del líquido de hilado y similares, y puede determinarse de manera adecuada. Por ejemplo, cuando la tensión aplicada es de aproximadamente 10 kV, la distancia es preferentemente de aproximadamente 5 a 50 cm, más preferentemente de aproximadamente 10 a 30 cm. Además, el potencial electrostático que va a aplicarse es en general de aproximadamente 3 a 100 kV, preferentemente de aproximadamente 5 a 50 kV, de manera adicionalmente preferible de aproximadamente 5 a 30 kV.

En el método de producción del tejido no tejido de la presente invención, se suministra un material protésico óseo durante la producción del tejido no tejido utilizando un método de electrohilado. Más específicamente, por ejemplo, el tejido no tejido de la presente invención puede producirse pulverizando una pequeña cantidad de una disolución disuelta de polímero biocompatible utilizando un método de electrohilado para obtener un tejido no tejido, dispersando una cantidad apropiada de material protésico óseo en el tejido no tejido, y pulverizando adicionalmente la disolución disuelta de polímero biocompatible en el mismo. El tejido no tejido de la presente invención se realiza preferentemente repitiendo esta serie de etapas de varias veces a varias decenas de veces (de manera específica, de aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente de aproximadamente 5 a 10 veces). En otras palabras, el procedimiento de producción del tejido no tejido de la presente invención incluye el procedimiento de producción anterior, y preferentemente incluye de varias a varias decenas de veces del procedimiento. Un procedimiento de producción preferible es un método de pulverizar la disolución disuelta de polímero biocompatible a una velocidad de 0,5 a 1,5  $\mu\text{l/s}$ , y añadir de 0,1 a 0,2 g de un material protésico óseo cada 15 minutos. En este método se añade aproximadamente de 1 a 2 g del material protésico óseo en total.

Durante el método de electrohilado, cuando el tejido no tejido producido se acumula hasta un grosor determinado, se vuelve difícil la carga negativa del electrodo de masa debido a la acumulación del tejido no tejido. Esto dificulta la pulverización de la disolución disuelta de polímero biocompatible. Por este motivo, ha sido difícil producir un tejido no tejido con un grosor relativamente grande utilizando un método de electrohilado conocido hasta ahora. Por tanto, en la presente invención, es preferible añadir, por ejemplo, la siguiente estructura al electrodo de masa para permitir la producción de un tejido no tejido que presenta un grosor relativamente grande. El electrodo de tierra es preferentemente, no una simple placa de metal (por ejemplo, una placa de aluminio o cobre), sino que está dotada de salientes (preferentemente, salientes cilíndricos o cónicos) en la placa de metal. Además, los salientes preferentemente pueden moverse hacia arriba y hacia abajo. Mediante la utilización de un electrodo de masa que presenta los salientes, cuando aumenta el grosor del tejido no tejido y la carga negativa del electrodo de masa se vuelve difícil, es posible facilitar la carga negativa del electrodo moviendo los salientes hacia arriba. Los salientes se proporcionan preferentemente en forma de una retícula con, por ejemplo, intervalos de aproximadamente 1 a 3 cm entre ellos. El área de sección de los salientes es preferentemente de aproximadamente 0,001 a 0,5  $\text{cm}^2$ , más preferentemente de aproximadamente 0,01 a 0,1  $\text{cm}^2$ . La presente invención también engloba un electrodo de masa para electrohilado que presenta una estructura de este tipo. Tal como se describe más adelante, la figura 2 muestra un ejemplo de un electrodo de masa para electrohilado que presenta la estructura anterior.

Puesto que el tejido no tejido de la presente invención garantiza invariablemente un aumento significativo en la eficacia de proliferación celular (es decir, la capacidad de proliferación celular) (en particular, de osteoblastos) cuando se utiliza como andamiaje de cultivo celular, el tejido no tejido de la presente invención puede utilizarse de manera adecuada como andamiaje de cultivo celular, y también como material de regeneración ósea. Más específicamente, en el caso de daño óseo debido a factores externos (por ejemplo, accidente), o en el caso de absorción o pérdida de hueso debido a factores internos (por ejemplo, osteoporosis, enfermedad periodontal), el tejido no tejido de la presente invención permite la rápida regeneración ósea (específicamente, incorporándose en o uniéndose a la parte afectada). En particular, el tejido no tejido de la presente invención presenta un grosor deseable, que no era posible para los materiales textiles no tejidos conocidos hasta ahora; por tanto, el tejido no tejido de la presente invención puede utilizarse para promover la regeneración ósea al incluirse, como en los materiales textiles no tejidos conocidos hasta ahora, en la parte objetivo (parte afectada).

En particular, en el tejido no tejido de la presente invención, el material protésico óseo está enmarañado alrededor de las fibras del tejido no tejido. Con esta estructura, el material protésico óseo presenta una alta capacidad de retención y tenacidad apropiada; por tanto, el tejido no tejido de la presente invención puede aplicarse (incluirse) fácilmente en la parte afectada, aun cuando la parte afectada tenga una forma complicada. El tejido no tejido también presenta permeabilidad celular y permeabilidad a los líquidos superior.

Una aplicación preferida del tejido no tejido de la presente invención es, pero sin limitarse a, en particular, regeneración del hueso alveolar en el tratamiento de implante.

En el método de GBR (regeneración ósea guiada) conocido hasta ahora, es necesario rellenar en primer lugar una región de regeneración del hueso alveolar con un material protésico óseo, y luego aplicar una membrana de protección para impedir la infiltración de tejido gingival o tejido epitelial, que interfiere con la regeneración del tejido óseo, en la región (más específicamente, el material protésico óseo y la membrana de protección deben aplicarse secuencialmente y colocarse juntos). Por tanto, el procedimiento secuencial de rellenado de la región objetivo con un material protésico óseo y luego la aplicación de una membrana de protección es engorroso para el usuario; además,

esta etapa requiere un alto nivel de habilidad por parte del usuario. En cambio, cuando el tejido no tejido de la presente invención se utiliza como reemplazo de un material protésico óseo, el tejido no tejido de la presente invención y la membrana de protección pueden aplicarse al mismo tiempo, reduciendo de ese modo la carga del usuario con una técnica más sencilla que la del método conocido hasta ahora. En particular, los métodos conocidos hasta ahora presentan a menudo un problema de fuga del material protésico óseo desde la parte aplicada; sin embargo, el problema puede resolverse utilizando el tejido no tejido de la presente invención en lugar de un material protésico óseo. Además, puesto que el tejido no tejido de la presente invención es flexible, puede deformarse a lo largo de la parte afectada, o cortarse para dar una forma apropiada según la forma de la parte afectada.

Además, al extender la longitud desde el material protésico óseo incluido dentro del tejido no tejido hasta el exterior del tejido no tejido de la presente invención (en otras palabras, al aumentar el grosor de la capa de fibras (la capa de fibras en contacto con el tejido gingival o el tejido epitelial) del tejido no tejido de la presente invención), es posible suprimir la infiltración de tejido gingival o tejido epitelial en la región de regeneración (más específicamente, es posible añadir una función como membrana de protección). En este caso, el tejido no tejido de la presente invención se utiliza de manera individual, en lugar de utilizar el conjunto de la membrana de protección y el material protésico óseo.

Además, tal como se describió anteriormente, el tejido no tejido de la presente invención se produce utilizando un método de electrohilado repitiendo una serie de las etapas de "pulverizar una pequeña cantidad de una disolución disuelta de polímero biocompatible para producir tejido no tejido, dispersar una cantidad apropiada de un material protésico óseo sobre el tejido no tejido, y pulverizar adicionalmente la disolución disuelta de polímero biocompatible en el mismo". Sin embargo, cambiando ligeramente el procedimiento de producción, también es posible producir tejido no tejido útil de diversas formas. Por ejemplo, repitiendo una serie de las etapas de pulverizar en primer lugar una gran cantidad de una disolución disuelta de polímero biocompatible para producir un tejido no tejido ancho y grueso, añadir un material protésico óseo sólo a una parte relativamente estrecha sobre el tejido no tejido, y pulverizar una disolución disuelta de polímero biocompatible a la parte estrecha, puede obtenerse un tejido no tejido en forma de sombrero de copa, que presenta un material protésico óseo proyectado incluido en una parte la base de tejido no tejido ancho y grueso. Si se supone que el tejido no tejido es un sombrero de copa, el tejido no tejido ancho y grueso es el ala y el resto del tejido no tejido que contiene un material protésico óseo es la copa. Este tejido no tejido en forma de sombrero de copa se aplica incluyendo la parte de copa en la región de regeneración del hueso alveolar. De este modo, la parte de borde sirve para inhibir la infiltración de tejido gingival o tejido epitelial en la región. Más específicamente, el tejido no tejido en forma de sombrero de copa sirve tanto como membrana de protección como material protésico óseo.

Como tal, el tejido no tejido de la presente invención puede utilizarse como material de regeneración ósea. Además, la presente invención también engloba una estructura en la que osteoblastos o similares se adhieren o añaden al tejido no tejido de la presente invención. Más específicamente, la presente invención engloba un material de regeneración ósea que contiene el tejido no tejido. El material de regeneración ósea puede estar compuesto sólo por el tejido no tejido, o también puede contener el tejido no tejido anterior que contiene osteoblastos. La incorporación de osteoblastos puede realizarse, por ejemplo, mediante un cultivo celular utilizando el tejido no tejido como material de andamiaje.

Además, el tejido no tejido de la presente invención puede utilizarse como material de andamiaje de cultivo de osteoblastos. En este caso, el tejido no tejido que presenta la misma característica que el material de regeneración ósea anterior, puede utilizarse como material de andamiaje de cultivo de osteoblastos.

Además, el tejido no tejido de la presente invención es útil como material de regeneración ósea. El material de regeneración ósea puede utilizarse, por ejemplo, para los siguientes tratamientos, cirugías u otras utilidades.

• Campo de regeneración de tejido periodontal y cirugía maxilofacial

Generación tisular guiada para defecto infraóseo, lesión de furcación de clase II, defecto de tipo encogimiento y defecto de tipo escisión; generación ósea guiada para aumento óseo del borde alveolar y generación ósea en las proximidades del implante; técnica de formación de borde alveolar; procedimiento de elevación de seno para técnica de elevación de fondo del seno maxilar; método de preservación de alvéolo para preservación de alvéolo en extracción; técnica de elevación de fondo de la cavidad nasal; cirugía de extensión ósea; rellenado óseo tras raspado de la parte ósea muerta; rellenado óseo tras raspado de tejido de cáncer de huesos; regeneración ósea en procedimiento de rellenado óseo para tratar fractura ósea traumática; tratamientos estéticos tales como para hiperplasia gingival con puente, recubrimiento de raíz para recesión gingival, reconstrucción de papila interdental, u otra hiperplasia gingival; y similares.

• Campo ortopédico

Cirugía de extensión ósea; tratamientos tras raspado de parte ósea muerta o tras raspado de tejido de cáncer de huesos, tratamientos de fractura ósea traumática, fractura por compresión vertebral, técnica de reconstrucción ósea

para tratamiento de pseudoartrosis; cirugía de extensión ósea; materiales portadores de componentes farmacéuticos para el tratamiento de la osteoporosis; y similares.

5 La presente invención también engloba un método de regeneración ósea que se realiza aplicando el tejido no tejido de la presente invención a un sitio objetivo sometido a regeneración ósea (preferentemente de hueso alveolar). El método puede utilizarse, por ejemplo, para los tratamientos o cirugías enumerados anteriormente.

**Ejemplos**

10 La presente invención se explica más específicamente a continuación. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos. En los experimentos, puede hacerse referencia de manera adecuada a los libros de texto, etc. (por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 Vol. Set); Cold Spring Harbor Laboratory Press), enumerados en la sección de campo técnico.

15 Producción de tejido no tejido 1

Se añadieron 43 g de una disolución mixta de alcohol hexafluoroisopropílico:diclorometano = 8:2 (razón en masa) a 7 g de un poli(ácido láctico) (Mitsui Chemicals, Inc. LACEA, H-400), obteniendo de ese modo una disolución de poli(ácido láctico) (al 14% p/p). Se llenó una jeringa (Henke SASS WOLF, 5 ml) con la disolución de poli(ácido láctico) obtenida, combinada con una aguja (aguja no biselada 21G1.1/2, Terumo Corporation), y se fijó en un dispositivo de electrohilado. Se fijó la distancia desde la jeringa hasta el suelo (el objetivo) a 8 cm y se pulverizó la disolución de poli(ácido láctico) mediante la aplicación de 10 kV de tensión, cambiando las condiciones, es decir, variando la duración de pulverización y la cantidad de pulverización, tal como se muestra en la tabla 1. Durante la pulverización, se añadió un material protésico óseo (OSferion, Olympus Terumo Biomaterials Corporation) cada 15 minutos lo más uniformemente posible hasta que la cantidad de adición total llegó a ser de 2 g. Se utilizó un material protésico óseo (OSferion) que presentaba un diámetro de 0,5 a 1,5 mm (valor convencional). Una vez añadida la cantidad total del material protésico óseo, se pulverizó la disolución de poli(ácido láctico) durante otros 15 minutos. De este modo, se produjeron los cuatro tipos de tejido no tejido mostrados en la tabla 1.

30 En este método de producción, se utilizó una placa de aluminio dotada de salientes de cobre que podían moverse hacia arriba y hacia abajo como electrodo de masa (que también servía como colector). La figura 2 muestra una vista esquemática del electrodo de masa. Durante la etapa de pulverización anterior, los salientes de cobre se elevaron 0,5 mm cada 15 minutos.

35 [Tabla 1]

Muestras producidas mediante el electrohilado (la muestra 0 no es según la invención)

Materiales textiles no tejidos producidos	Cantidad de pulverización	Duración de pulverización	Cantidad de adición de material protésico óseo	Intervalo de adición de material protésico óseo	Cantidad de adición total de material protésico óseo
Tejido no tejido sin material protésico óseo (Muestra 0)	0,6 µl/s	120 min	-	-	-
Tejido no tejido (Muestra 1)	0,6 µl/s	165 min	0,2 g	15 min	2 g
Tejido no tejido (Muestra 2)	1,2 µl/s	165 min	0,2 g	15 min	2 g
Tejido no tejido (Muestra 3)	1,2 µl/s	315 min	0,1 g	15 min	2 g

40 Evaluación de las propiedades físicas del tejido no tejido 1

Utilizando el método a continuación, se midieron el grosor, la densidad aparente y la proporción del material protésico óseo con respecto a los cuatro tipos de tejido no tejido (muestras 0, 1, 2 y 3); y el diámetro de fibra de las fibras de cada material textil.

45 Se cortó cada muestra para dar un rectángulo (de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup>), y se midió el peso de cada rectángulo. Se encontró la longitud, la anchura y el grosor de la muestra utilizando un calibre de grosor (calibre de grosor digital, Ozaki Seisakusho, DG-205M). Se multiplicaron los valores obtenidos de longitud, anchura y grosor para encontrar el volumen (cm<sup>3</sup>). Se encontró el grosor obteniendo el promedio de los valores de medición de 20 partes.

50 La densidad aparente se determinó según la fórmula siguiente a partir del peso y el volumen de cada muestra.

Densidad aparente ( $\text{g/cm}^3$ ) = peso de muestra (g)/volumen de muestra ( $\text{cm}^3$ )

5 Cada muestra así cortada para dar un rectángulo se colocó en un tubo cónico, y se añadieron 50 ml de diclorometano al mismo, disolviendo de ese modo el poli(ácido láctico) contenido en la muestra. Entonces, dejando un precipitado en el tubo cónico, se retiró el sobrenadante. Se evaporó el diclorometano en el precipitado, y se midió el peso del precipitado restante como el peso del material protésico óseo. La proporción de material protésico óseo se determinó según la fórmula siguiente.

10 Proporción de material protésico óseo (%) = (materiales insolubles en diclorometano (precipitados)/peso de muestra)x100

15 Además, se obtuvo una imagen de la sección transversal de cada muestra utilizando un microscopio electrónico de barrido (Hitachi High-Technologies Corporation, S-3400N). A partir de una imagen ampliada 500x obtenida mediante el microscopio electrónico de barrido, se encontró el diámetro de fibra utilizando ImageJ (versión 1.43u: software de procesamiento de imágenes desarrollado por NIH). El diámetro de fibra de cada muestra se encontró obteniendo el promedio de los diámetros de 50 fibras.

20 La figura 3 muestra imágenes de secciones transversales de las muestras. En la figura 3, las imágenes A, B, C y D corresponden a las muestras 0, 1, 2 y 3, respectivamente. Haciendo referencia a la figura 3, se confirmó que, a diferencia de la muestra 0, las muestras 1 a 3 que contenían un material protésico óseo presentaban un grosor suficiente. La figura 4 muestra imágenes de la sección transversal de la muestra 3 obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido. La figura 4 también muestra una vista esquemática de las mismas.

25 La tabla 2 muestra los resultados de la evaluación de las propiedades físicas.

[Tabla 2]

30 Evaluación de las propiedades físicas de los materiales textiles no tejidos

Muestras	Proporción de material protésico óseo	Grosor	Diámetro de fibra	Densidad aparente
Tejido no tejido sin material protésico óseo (Muestra 0)	0%	0,163 mm $\pm$ 0,044	2,685 $\mu\text{m}$ $\pm$ 0,322	-
Tejido no tejido (Muestra 1)	97,4%	2,415 mm $\pm$ 0,430	3,435 $\mu\text{m}$ $\pm$ 0,741	0,179 $\text{g/cm}^3$
Tejido no tejido (Muestra 2)	91,6%	2,733 mm $\pm$ 0,427	3,170 $\mu\text{m}$ $\pm$ 0,997	0,194 $\text{g/cm}^3$
Tejido no tejido (Muestra 3)	89,0%	2,500 mm $\pm$ 0,529	2,630 $\mu\text{m}$ $\pm$ 0,473	0,216 $\text{g/cm}^3$

35 Además, para las muestras 1 a 3, se calculó la porosidad (%) del tejido no tejido y la porosidad (%) de las fibras del tejido no tejido. En el cálculo, se utilizó una densidad real de 1,26  $\text{g/cm}^3$  como la densidad real del poli(ácido láctico), y se utilizó una densidad real de 3,17  $\text{g/cm}^3$  como la densidad real del material protésico óseo (OSferion). Las densidades reales se encontraron utilizando un densímetro automático en seco (AccuPyc 1330; Shimadzu Corporation).

[Tabla 3]

Artículo	Por 1 cm <sup>3</sup> de tejido no tejido								
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)
	Proporción de material protésico óseo (OSferion)	Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	Peso de material protésico óseo (g)	Volumen correspondiente a material protésico óseo (cm <sup>3</sup> )	Peso de poli(ácido láctico) (g)	Volumen correspondiente a poli(ácido láctico) (cm <sup>3</sup> )	Volumen total de material protésico óseo y poli(ácido láctico) (cm <sup>3</sup> )	Razón de vacío del tejido no tejido (%)	Razón de vacío de las fibras del tejido no tejido (%)
Muestra 1	97,4%	0,179	0,174	0,055	0,005	0,004	0,059	94,1%	99,6%
Muestra 2	91,6%	0,194	0,178	0,056	0,016	0,013	0,069	93,1%	98,6%
Muestra 3	89,0%	0,216	0,192	0,061	0,024	0,019	0,080	92,0%	98,0%
Fórmula de cálculo			(a x b)	(c/3,17)	(b - c)	(e/1,26)	(d + f)	(1-g) x 100	$[1 - \{f/(1 - d)\}] \times 100$

El grosor del tejido no tejido de poli(ácido láctico) (muestra 0) que no contenía un material protésico óseo era pequeño, concretamente de 0,163 mm; este grosor no es suficiente, en particular, como material de regeneración ósea que sirve como relleno de la parte afectada (parte de defecto óseo). Los materiales textiles no tejidos de poli(ácido láctico) (muestras de 1 a 3) que contenían un material protésico óseo eran todos materiales textiles no tejidos relativamente gruesos que presentaban un grosor de 2 a 3 mm; por tanto, cuando los materiales textiles no tejidos se presionaron con la mano, se recuperó el grosor cuando se liberaron. Tales materiales textiles no tejidos son adecuados como material de regeneración ósea.

#### Evaluación de la capacidad de proliferación celular del tejido no tejido

Se examinaron las capacidades de proliferación celular de los materiales textiles no tejidos (muestras 1 a 3) según el procedimiento siguiente. Más específicamente, se examinó la cantidad de ADN de las células proliferadas por cada muestra para determinar la capacidad de proliferación celular.

##### • Cultivo celular

Se cortó cada muestra de tejido no tejido (muestras 1 a 3) para proporcionar un trozo que presentaba el mismo tamaño que el fondo de una placa de 48 pocillos (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., SUMILON, MS-80480), y se colocó sobre el fondo del pocillo. Cada muestra contenía aproximadamente un equivalente de 50 mg de material protésico óseo. Como muestra de control, se colocaron aproximadamente 50 mg del propio material protésico óseo (OSferion) en el fondo de un pocillo de la placa de 48 pocillos.

Se colocó un tubo de acero inoxidable (cubeta de penicilina) sobre cada muestra de evaluación, y se añadieron al mismo 500  $\mu$ l de medio de cultivo MEM/FBS al 10% (medio de cultivo MEM/FBS al 10% que contenía antibióticos y ácido glutámico; a continuación en la presente memoria, "medio de cultivo MEM/FBS al 10%" indica este medio). Cada muestra así preparada se centrifugó durante 5 minutos utilizando una centrífuga de placas (2500 rpm, temperatura ambiente). Tras la evacuación, las muestras se centrifugaron adicionalmente durante otros 5 minutos (2500 rpm, temperatura ambiente). Además, se añadieron 200  $\mu$ l de medio de cultivo MEM/FBS al 10% al mismo, y se incubaron las muestras durante al menos una hora en un incubador (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Se retiraron 500  $\mu$ l del medio de cultivo mediante succión. Se suspendieron células derivadas de osteosarcoma humano MG-63 en un medio de cultivo MEM/FBS al 10% en una cantidad de  $1,6 \times 10^5$  células/ml, y se sembraron 100  $\mu$ l de cada una de las células resultantes en cada pocillo ( $1,6 \times 10^4$  células/pocillo). Tras 5 horas de incubación, se unieron las células a las muestras de evaluación. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ l de medio de cultivo MEM/FBS al 10% y se cultivaron las muestras. Se examinaron las muestras en el día 1, el día 3 y el día 8 de la incubación para determinar la capacidad de proliferación celular.

##### • Medición de la capacidad de proliferación celular

Tras el cultivo, se extrajo cada muestra de evaluación (tejido no tejido) que presentaba células unidas al mismo y se colocó en una placa que contenía PBS (solución salina fisiológica tamponada con fosfato). Se midió el peso de cada muestra de evaluación que contenía PBS, y se encontró una cantidad de absorción de agua de la muestra de evaluación a partir del peso seco de la muestra de evaluación y el peso de la muestra de evaluación que contenía PBS (restando el peso seco (medido en el momento en que se cortó cada muestra de evaluación para dar un trozo del mismo tamaño que el fondo de la placa) antes de someterse al experimento a partir del peso de la muestra de evaluación que contenía PBS).

Se añadió una disolución tampón de TE (Tris/Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) a la placa de modo que la cantidad de disolución total de la muestra incluyendo la cantidad de absorción de agua y la disolución tampón de TE llegó a ser de 1200  $\mu$ l. Se realizó una congelación y descongelación secuencial de la muestra (congelada a -80°C y disuelta a temperatura ambiente) dos veces, seguido por tratamiento con ultrasonidos durante 30 minutos, alterando de ese modo las células. Se añadieron 100  $\mu$ l de un líquido de lisado celular (es decir, líquido de células alteradas obtenido a través de la congelación y descongelación y el tratamiento con ultrasonidos) a una placa de medición de fluorescencia de 96 pocillos (Nunc black microwell, cat. 137101) para obtener la medición de las muestras.

Se diluyó PicoGreen (Invitrogen) (desde 100  $\mu$ l hasta 20 ml) con una disolución tampón de TE; se añadieron 100  $\mu$ l de la misma a cada muestra de medición, y se incubó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se midió la intensidad de fluorescencia de cada muestra utilizando un lector de placas de fluorescencia (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices) a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. PicoGreen es un colorante utilizado específicamente para ADN bicatenario; por tanto, la intensidad de fluorescencia resultante refleja la cantidad de ADN (y el número de las células). La figura 5 muestra los resultados. En comparación con el caso (control) que utiliza sólo un material protésico óseo, se adhirieron muchas células a los materiales textiles no tejidos de poli(ácido láctico) gruesos (muestras 1 a 3) que contenían un material protésico óseo. Así se confirmó la proliferación celular. Por tanto, se confirmó que estos materiales textiles no tejidos son superiores como material de regeneración ósea.

Medición del tamaño de poro del tejido no tejido

5 Se midió el tamaño de poro (modo) del tejido no tejido según el método de semisecado (regla ASTM E1294-89) utilizando perfluoropoliéster (utilizando un adaptador de medición circular que presenta un diámetro de 7 mm). Se utilizó un porómetro de flujo capilar (CFP-1200-AEL, Porous Materials Inc.) como dispositivo de medición. El intervalo de clase en el cálculo del modo fue de 1 µm.

Producción de tejido no tejido 2

10 Se añadieron 45 g de una disolución mixta de alcohol hexafluoroisopropílico:diclorometano = 8:2 (razón en masa) a 5 g de un poli(ácido láctico) (Evonik Degussa Japan, RESOMER®) para disolver el poli(ácido láctico), obteniendo de ese modo una disolución de poli(ácido láctico) (al 10% en peso). Se llenó una jeringa (Henke SASS WOLF, 5 ml) con la disolución de poli(ácido láctico) obtenido, y se fijó en un dispositivo de electrohilado (MEC Co., Ltd., NF-103A). Se fijó la distancia desde la jeringa hasta el electrodo de masa (el objetivo: un bloque de aluminio de 4x4 cm que presentaba el mismo mecanismo que en la figura 2) a 22 cm, y se pulverizó la disolución de poli(ácido láctico) mediante la aplicación de 15 kV de tensión durante 90 minutos en total en una cantidad de 1 ml/hora. Durante la pulverización, se añadieron uniformemente 0,033 g de un material protésico óseo (OSferion GI, Olympus Terumo Biomaterials Corporation) y polvo obtenido pulverizando el material protésico óseo y ajustando el diámetro de partícula mediante tamizado 30 veces cada 3 minutos hasta que la cantidad de adición total llegó a ser de aproximadamente 1 g. De este modo, se produjeron los cinco tipos (A, B, C, D y E) de tejido no tejido mostrados en la tabla 4.

25 Se produjo un tejido no tejido de la misma manera que anteriormente utilizando un material en forma de bloque (un sólido rectangular de 20 mm x 10 mm x 3,5 mm) OSferion (OSferion A1) como material protésico óseo. Este tejido no tejido se denomina a continuación en la presente memoria "tejido no tejido F" (tabla 4).

[Tabla 4] Los materiales textiles A, E y F no son según la invención.

Materiales textiles no tejidos producidos	Cantidad de pulverización (ml/hora)	Duración de pulverización (min)	Cantidad de adición de material protésico óseo (g)	Intervalo de adición de material protésico óseo (min)	Cantidad de adición total de material protésico óseo (g)	Diámetro de partícula de material protésico óseo (µm)
Tejido no tejido sin material protésico óseo (tejido no tejido A)	1,0	90	-	-	-	-
Tejido no tejido B		93	0,033	3	1	75-180
Tejido no tejido C						150-810
Tejido no tejido D						500-1500
Tejido no tejido E						4700-8000
Tejido no tejido F	1,0	93	0,5	31	1	Bloque de 20 mm x 10 mm x 3,5 mm

30

Evaluación de las propiedades físicas del tejido no tejido 2

35 Utilizando el método a continuación, se midieron y se calcularon el grosor, la densidad aparente y la proporción del material protésico óseo con respecto a los seis tipos de tejido no tejido (A a F), y el diámetro de fibra de las fibras de cada material textil.

40 Se cortó cada muestra para dar un cuadrado de 4x4 cm y se midió el peso de cada muestra. Se midió el grosor de la muestra utilizando un micrómetro Digimatic (Mitutoyo Corporation, CLM1-15QM). El grosor de la muestra se encontró obteniendo el promedio de los valores de medición de 20 partes.

40

Entonces, de la misma manera que en el método explicado en la sección anterior “Evaluación de las propiedades físicas del tejido no tejido 1”, se midieron y se calcularon la densidad aparente, la proporción de material protésico óseo de los materiales textiles no tejidos A a F, y el diámetro de fibra de las fibras de cada material textil, excepto porque el diámetro de fibra se encontró utilizando una imagen de microscopio electrónico ampliada 2000x, en lugar de utilizar una imagen ampliada 500x.

La tabla 5 representa los resultados de la evaluación de las propiedades físicas. Puesto que el tejido no tejido F se produjo utilizando un material protésico óseo en forma de bloque, la densidad aparente del tejido no tejido F fue mayor que las de otros materiales textiles no tejidos.

[Tabla 5]

Muestras	Proporción de material protésico óseo (%)	Grosor (mm)	Diámetro de fibra (μm)	Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )
Tejido no tejido sin material protésico óseo (Tejido no tejido A)	0	0,24 ± 0,02	2,52 ± 0,20	0,273
Tejido no tejido B	75,0	1,70 ± 0,18	1,99 ± 0,26	0,379
Tejido no tejido C	92,43	2,96 ± 0,17	2,43 ± 0,23	0,214
Tejido no tejido D	94,0	3,59 ± 0,39	2,20 ± 0,33	0,152
Tejido no tejido E	92,1	4,68 ± 1,09	2,08 ± 0,15	0,145
Tejido no tejido F	90,9	1,16 ± 1,34	2,25 ± 0,31	0,595

Además, se calculó la porosidad (%) de cada tejido no tejido y la porosidad (%) de las fibras de cada tejido no tejido. Más específicamente, el cálculo se realizó utilizando una densidad real de 1,26 g/cm<sup>3</sup> como la densidad real del poli(ácido láctico), y una densidad real de 3,17 g/cm<sup>3</sup> como la densidad real del material protésico óseo (OSferion) de la misma manera que en el método explicado en la sección anterior “Evaluación de las propiedades físicas del tejido no tejido 1”, excepto porque se calculó la porosidad de las fibras del tejido no tejido F utilizando una densidad real de 0,7065 g/cm<sup>3</sup> como la densidad real del material protésico óseo, porque el material protésico óseo en forma de bloque contenido en el tejido no tejido F presentaba muchos vacíos. La tabla 6 muestra los resultados.

La porosidad de las fibras del tejido no tejido F fue menor que las de los otros materiales textiles no tejidos, ya que contiene un material protésico óseo en forma de bloque. Por tanto, el tejido no tejido F era relativamente más duro que los materiales textiles no tejidos.

[Tabla 6]

Muestras	Razón de vacío del tejido no tejido (%)	Razón de vacío de las fibras del tejido no tejido (%)
Tejido no tejido sin material protésico óseo (Tejido no tejido A)	78,3	78,3
Tejido no tejido B	83,5	91,7
Tejido no tejido C	92,5	98,6
Tejido no tejido D	94,8	99,2
Tejido no tejido E	94,9	99,1
Tejido no tejido F	78,6	81,6

### Producción de tejido no tejido 3

Se produjo tejido no tejido α de la misma manera que en el método explicado en la sección anterior “Producción de tejido no tejido 2”, excepto porque la concentración de la disolución de poli(ácido láctico) fue el 5% en peso y la disolución de poli(ácido láctico) se pulverizó desde el dispositivo de electrohilado durante 195 minutos en total en una cantidad de 1 ml/hora; una vez pulverizada la disolución de poli(ácido láctico) durante 15 minutos, se añadieron 0,03 g de un material protésico óseo cada 6 minutos hasta que la cantidad de adición total llegó a ser de aproximadamente 1 g.

### Evaluación de las propiedades físicas del tejido no tejido 3

De la misma manera que en el método explicado en la sección anterior “Evaluación de las propiedades físicas del tejido no tejido 2”, se midieron y se calcularon el grosor, la densidad aparente y la proporción del material protésico óseo del tejido no tejido α, y el diámetro de fibra de las fibras del material textil tridimensional. Además,

se calcularon la porosidad (%) del tejido no tejido tridimensional y la porosidad (%) de las fibras del tejido no tejido tridimensional. Las tablas 7 y 8 muestran los resultados.

[Tabla 7]

5

Muestra	Proporción de material protésico óseo (%)	Grosor (mm)	Diámetro de fibra ( $\mu\text{m}$ )	Densidad aparente ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
Tejido no tejido $\alpha$	95,0	3,91	$0,35 \pm 0,17$	0,156

[Tabla 8]

Muestra	Razón de vacío del tejido no tejido (%)	Razón de vacío de las fibras del tejido no tejido (%)
Tejido no tejido $\alpha$	94,7	99,3

10 Producción de tejido no tejido 4

Utilizando un bloque de aluminio de 6x25 cm como electrodo de masa, se produjo tejido no tejido  $\beta$  de la misma manera que en el método explicado en la sección anterior "Producción de tejido no tejido 2", excepto porque el intervalo fue de 16 cm, y se pulverizó la disolución de poli(ácido láctico) durante 360 minutos en total en una cantidad de 1 ml/hora; durante la pulverización se añadieron uniformemente 0,135 g de un material protésico óseo (OSferion) a una muestra de 4x16 cm 59 veces cada 6 minutos hasta que la cantidad de adición total llegó a ser de aproximadamente 8 g.

20 Evaluación de las propiedades físicas del tejido no tejido 4

De la misma manera que en el método explicado en la sección anterior "Evaluación de las propiedades físicas del tejido no tejido 2", se midieron y se calcularon el grosor, la densidad aparente y la proporción del material protésico óseo del tejido no tejido  $\beta$ , y el diámetro de fibra de las fibras del material textil tridimensional. Además, se calcularon la porosidad (%) del tejido no tejido tridimensional y la porosidad (%) de las fibras del tejido no tejido tridimensional. Las tablas 9 y 10 muestran los resultados.

[Tabla 9]

Muestra	Proporción de material protésico óseo (%)	Grosor (mm)	Diámetro de fibra ( $\mu\text{m}$ )	Densidad aparente ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
Tejido no tejido $\beta$	$89,0 \pm 1,1$	$6,34 \pm 0,18$	$2,11 \pm 0,24$	0,155

30 [Tabla 10]

Muestra	Razón de vacío del tejido no tejido (%)	Razón de vacío de las fibras del tejido no tejido (%)
Tejido no tejido $\beta$	94,3	98,6

Implante de tejido no tejido

35 Se implantó tejido no tejido  $\beta$  en una rata, y se examinó el nivel de infiltración celular en el tejido conjuntivo. Como control, también se implantó el propio material protésico óseo en forma de bloque (OSferion A1) en una rata.

40 Se adquirió una rata macho SD (8 semanas de edad, aproximadamente 200 g) para utilizarse como animal de experimentación. Se anestesió la rata mediante inhalación de isoflurano al 2,5%, se afeitó el pelo del lomo para exponer el sitio objetivo y se esterilizó el sitio con Isodine® y un alcohol para fricciones. Se abrió mediante corte la piel del lomo, y se realizó un hueco en el tejido conjuntivo suelto. Se incluyó tejido no tejido  $\beta$  o un material protésico óseo en forma de bloque (10 x 10 x 5 mm, Olympus Terumo Biomaterials Corporation, cortado de OSferion A1) en el hueco, y se cerró la incisión con un hilo de sutura. Dos semanas después del implante, la rata sometida al implante se desangró a partir de la aorta abdominal con anestesia mediante inhalación de isoflurano al 2,5% de modo que se sacrificó la rata. Tras confirmar la muerte de la rata, se obtuvo la muestra incluida con el tejido circundante. Se sumergió la muestra obtenida en un líquido de formalina tamponada neutra al 10% (Mildform®, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y se inmovilizó. A continuación, se obtuvo un fragmento tisular no descalcificado congelado de la muestra para someterse a tinción con hematoxilina-eosina. La muestra de  
50 fragmento tisular resultante se observó con un microscopio óptico. Las tablas 6a y 6b muestran los resultados. La

infiltración del tejido no tejido  $\beta$  en el tejido conjuntivo fue más deseable que el del material protésico óseo en forma de bloque.

Examen de la propiedad de infiltración celular 1

5

- Cultivo celular

Se cortó cada uno de los materiales textiles no tejidos A a D para dar un trozo que presentaba un diámetro de aproximadamente 1 cm, y se colocó sobre el fondo de una placa de 24 pocillos (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., SUMILON, MS-80480). Se presionó cada muestra de evaluación con una cubeta de penicilina (tubo de acero inoxidable), y se humedeció con 10000  $\mu$ l de un medio de cultivo MEM/FBS al 10% que contenía antibióticos y ácido glutámico (a continuación en la presente memoria, todos los medios de cultivo MEM/FBS al 10% contienen antibióticos y ácido glutámico a menos que se especifique de otro modo), seguido por evacuación. Se incubaron las muestras en un incubador durante al menos una hora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se suspendieron células MG-63 cultivadas previamente (derivadas de osteosarcoma humano, Human Science Research Resources Bank, Lote 05262004) en un medio de cultivo MEM/FBS al 10% en una cantidad de 3,2 x 10<sup>5</sup> células/ml, y se sembraron 100  $\mu$ l del mismo en cada pocillo (3,2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo). Tras el cultivo durante la noche, las células se utilizaron como muestras de evaluación.

- Evaluación de la propiedad de infiltración celular

Se inmovilizaron las células con una disolución de paraformaldehído al 4% durante una hora y se lavaron con PBS. A continuación, se congeló cada muestra con hexano con enfriamiento en hielo seco y se incluyó en CMC al 4% en estado congelado. Se cortó la muestra congelada para dar un trozo de 30  $\mu$ l de grosor y se sometió a tinción con hematoxilina-eosina (tinción con HE). Se observó la muestra cortada con un microscopio vertical (Olympus Corporation, BH-2). Además, utilizando ImageJ versión 1.44, se midió la distancia de infiltración celular máxima. La figura 7 muestra los resultados. Se confirmó que la propiedad de infiltración celular aumenta a medida que aumenta la porosidad del material textil y la porosidad de las fibras.

Producción de tejido no tejido 5

Se produjo tejido no tejido  $\gamma$  de la misma manera que en el método explicado en la sección anterior "Producción de tejido no tejido 4", excepto porque la disolución de poli(ácido láctico) se pulverizó durante 120 minutos en total; durante la pulverización, se añadieron uniformemente 0,135 g de un material protésico óseo (OSferion GI) a una muestra de 4 x 16 cm 39 veces cada 3 minutos hasta que la cantidad de adición total llegó a ser de aproximadamente 5,3 g.

Examen de la propiedad de infiltración celular 2

Se examinaron las propiedades de infiltración celular del tejido no tejido  $\beta$  y el tejido no tejido  $\gamma$  tal como sigue realizando cultivo celular utilizando los materiales textiles no tejidos  $\beta$  y  $\gamma$ . Se cortó cada uno de los materiales textiles no tejidos  $\beta$  y  $\gamma$  para dar un trozo que presentaba un diámetro de aproximadamente 1 cm. Cada muestra se humedeció completamente en un medio de cultivo MEM/FBS al 10% mediante evacuación. Entonces, se incubaron las muestras en un incubador durante al menos una hora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Se suspendieron células MG-63 cultivadas previamente (derivadas de osteosarcoma humano, Human Science Research Resources Bank, Lote 05262004) en un medio de cultivo MEM/FBS al 10% en una cantidad de 1,6 x 10<sup>5</sup> células/ml y se sumergió cada muestra de evaluación en 10 ml de la disolución de células durante 60 minutos. Se agitó suavemente cada muestra en la disolución cada 15 minutos. Cada muestra se extrajo de la disolución celular y se colocó sobre el fondo de una placa de 24 pocillos (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., SUMILON, MS-80240). Se añadió 1 ml de medio y cada muestra se presionó con una cubeta de penicilina (tubo de acero inoxidable) y se cultivó durante la noche. Los materiales textiles no tejidos de cultivo celular obtenidos se utilizaron como muestras. Se inmovilizaron las células con una disolución de paraformaldehído al 4% durante una hora y se lavaron con PBS. A continuación, se congeló la muestra con hexano con enfriamiento en hielo seco y se incluyó en CMC al 4% en estado congelado. Se cortó la muestra congelada para dar un trozo de 30  $\mu$ l de grosor y se sometió a tinción con HE. Se observó la muestra cortada con un microscopio (Olympus Corporation, BH-2) para evaluar la propiedad de infiltración celular.

De la misma manera que en el método explicado en la sección anterior "Medición del tamaño de poro de tejido no tejido", se midió el tamaño de poro de cada tejido no tejido. Sin embargo, en la medición de los tamaños de poros de los materiales textiles no tejidos  $\beta$  y  $\gamma$ , se despegaron las superficies exteriores de los materiales textiles no tejidos y la capa obtenida se utilizó para la medición.

La figura 8 muestra los resultados. Los tamaños de poro en la figura 8 son los modos.

Además, se midió la distancia interfibra del tejido no tejido de la siguiente manera. Se sumergió cada muestra de medición (tejido no tejido) en PBS y se desespumó a presión reducida. La muestra húmeda con PBS se hundió en gel de CMC (carboximetilcelulosa) al 4% y se congeló, preparando de ese modo un bloque congelado. Se obtuvo una muestra que presentaba un grosor de 2  $\mu\text{m}$  a partir del bloque obtenido y se selló en una resina entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Se observó una muestra cortada con un microscopio de contraste de fases. Se detectó la sección transversal de la fibra a partir de la imagen obtenida y se midió la distancia interfibra utilizando el método del centroide. El análisis en el método del centroide se realizó utilizando el software "A-Zo Kun" (Asahi Kasei Engineering Corporation, versión 2.20). La figura 9 muestra el resumen del análisis. Las distancias interfibra de los materiales textiles no tejidos  $\beta$  y  $\gamma$ , y la muestra de tejido no tejido 2 así medida fue de 18,4  $\mu\text{m}$ , 27,2  $\mu\text{m}$  y 33,3  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Examen de la propiedad de infiltración celular 3 (ejemplo de referencia)

Con el fin de analizar la relación entre la propiedad de infiltración celular y el tamaño de poro del tejido no tejido, se produjo un tejido no tejido general (materiales textiles no tejidos planos (i) a (iii): tabla 11) y se examinó la propiedad de infiltración celular.

[Tabla 11]

Materiales textiles no tejidos producidos	Cantidad de pulverización (ml/hora)	Duración de pulverización (min)
Tejido no tejido (i)	1,0	60
Tejido no tejido (ii)		180
Tejido no tejido (iii)		

Más específicamente, se añadieron 5 g de una disolución mixta de alcohol hexafluoroisopropílico:diclorometano = 8:2 (razón en masa) a 5 g de un poli(ácido láctico) (Evonik Degussa Japan, RESOMER®, L 206S)) para disolver el poli(ácido láctico), obteniendo de ese modo una disolución de poli(ácido láctico) (al 10% en peso). Se llenó una jeringa (Henke-Sass, Wolf GmbH, 5 ml) con la disolución de poli(ácido láctico) obtenido, y se fijó en un dispositivo de electrohilado (MEC Co., Ltd., NF-103A). Se fijó la distancia desde la jeringa hasta el electrodo de masa (el objetivo: bloque de aluminio de 3x3 cm) a 25 cm y se pulverizó la disolución de poli(ácido láctico) mediante la aplicación de 15 kV de tensión durante 60 minutos en total en una cantidad de 1 ml/hora, obteniendo de ese modo el tejido no tejido (i). Además, se obtuvieron los materiales textiles no tejidos (ii) y (iii) de la misma manera que el tejido no tejido (i), excepto porque se utilizó un tipo diferente de tambor rotatorio como electrodo de masa.

Se examinaron las propiedades de infiltración celular de los materiales textiles no tejidos (i) a (iii) de la misma manera que en la sección anterior "Examen de la propiedad de infiltración celular 2". Sin embargo, en la medición del tamaño de poro del tejido no tejido (i), el intervalo de clase en el cálculo del modo fue de 0,1  $\mu\text{m}$ . La figura 10 muestra los resultados. Los tamaños de poro en la figura 10 son los modos. La "distancia de infiltración máxima" en la figura 10 se encontró a partir de imágenes de fragmentos tisulares teñidos con HE. Las distancias interfibra de los materiales textiles no tejidos (i), (ii) y (iii) así medidas fueron de 7,3  $\mu\text{m}$ , 13,4  $\mu\text{m}$  y 15,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Tejido no tejido que contiene un material protésico óseo en el que el material protésico óseo está incluido entre fibras biocompatibles que constituyen el tejido no tejido, el material protésico óseo presenta un diámetro de partícula de 50 a 5000  $\mu\text{m}$ , y el tejido no tejido presenta una porosidad de 80 a 97%.
2. Tejido no tejido según la reivindicación 1, en el que las fibras biocompatibles contienen un polímero biocompatible.
- 10 3. Tejido no tejido según la reivindicación 2, en el que el polímero biocompatible es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímero de poli(ácido láctico)-poli(ácido glicólico), policaprolactona, quitina, colágeno, polilisina, poliarginina, ácido hialurónico, sericina, celulosa, dextrano y pululano.
- 15 4. Tejido no tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el material protésico óseo es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -fosfato de tricalcio),  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -fosfato de tricalcio), HA (hidroxiapatita), DCPD (fosfato de calcio dibásico dihidratado), OCP (fosfato de octacalcio), 4CP (fosfato de tetracalcio), alúmina, circonita, aluminato de calcio ( $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ ), aluminosilicato ( $\text{Na}_2\text{O-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ ), vidrio bioactivo, cuarzo y carbonato de calcio.
- 20 5. Tejido no tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las fibras del tejido no tejido presentan una porosidad de 80 a 99,99%.
- 25 6. Tejido no tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la densidad aparente ( $\text{g/cm}^3$ ) del tejido no tejido es 0,1 a 0,6.
7. Material de regeneración ósea que comprende el tejido no tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 30 8. Material de andamiaje de cultivo de osteoblastos que comprende el tejido no tejido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

Fig. 1

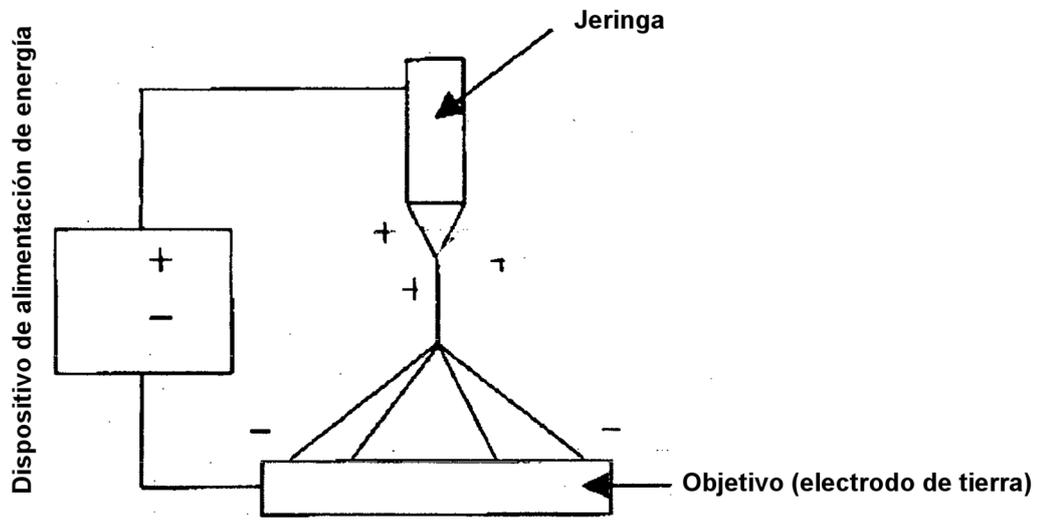


Fig. 2

**Electrodo de tierra que sobresale**

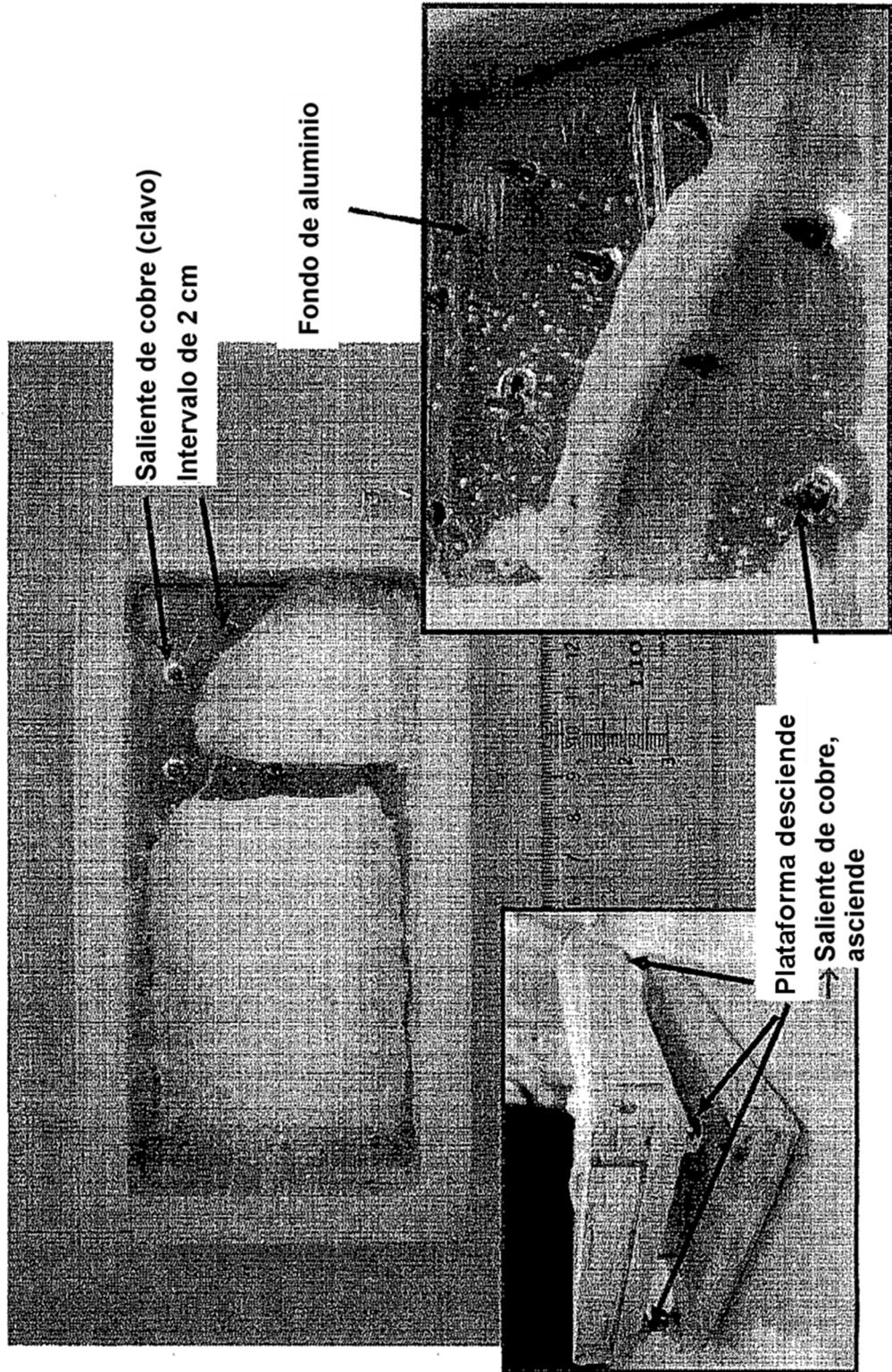


Fig. 3

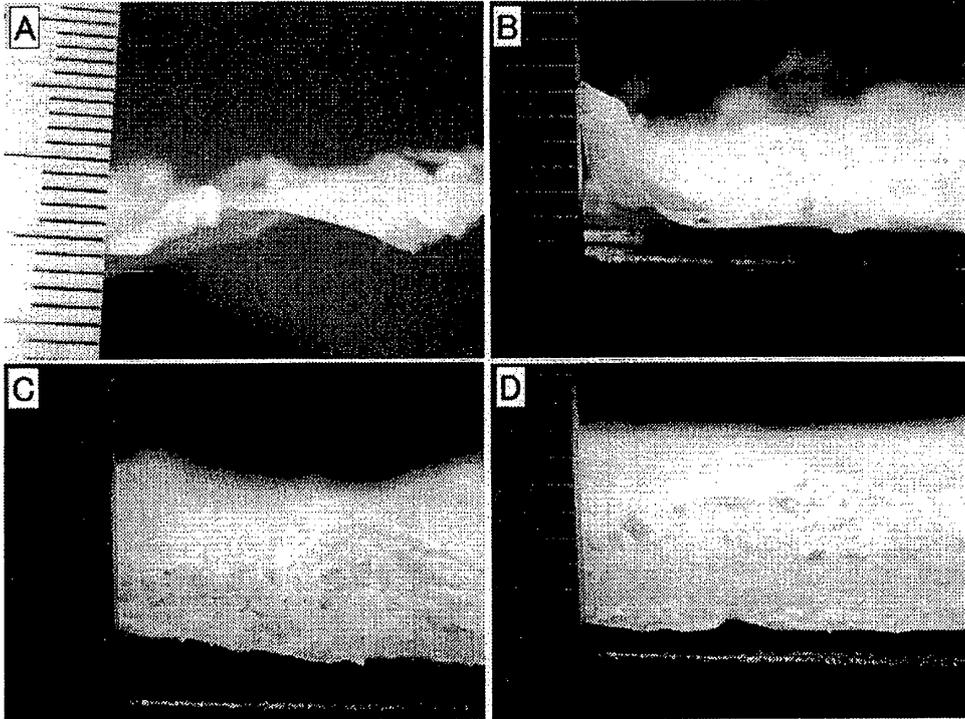


Fig. 4

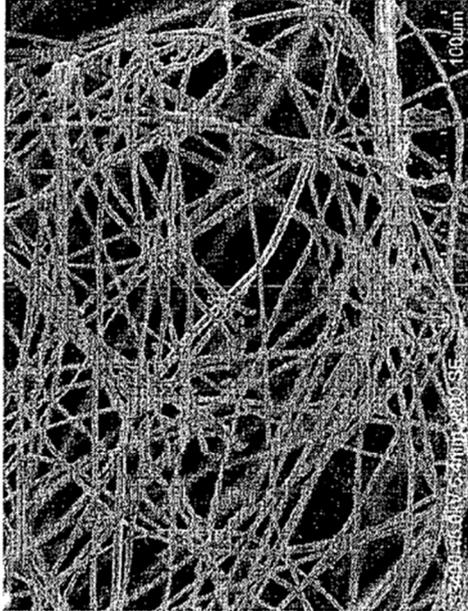


Imagen al microscopio electrónico de la parte de tejido no tejido x500



Imagen al microscopio electrónico 75x



Diagrama esquemático

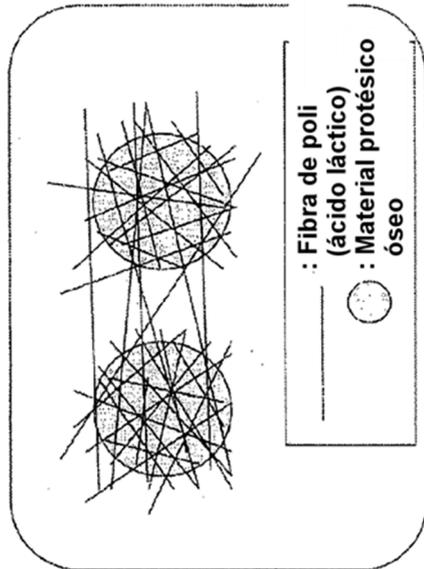


Fig. 5

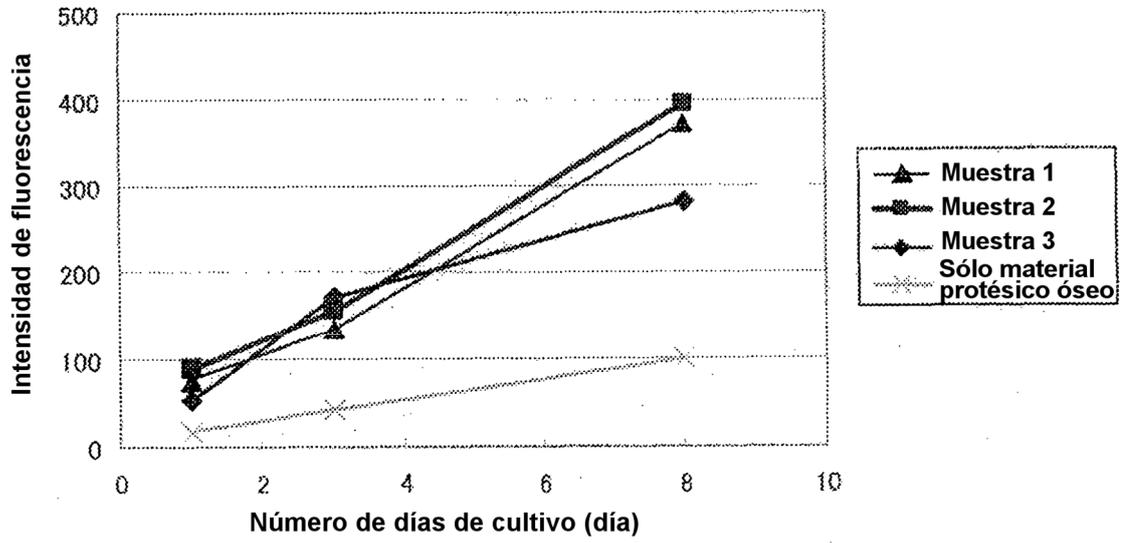
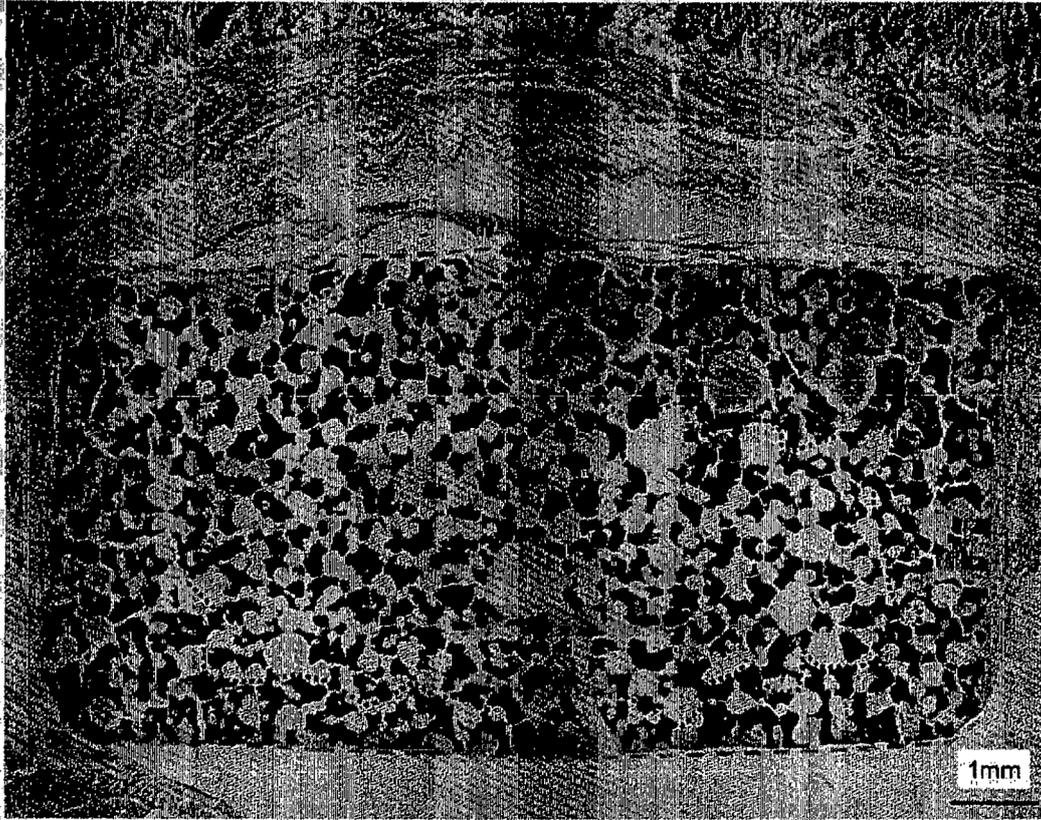


Fig. 6a



--- indica el contorno del implante e ... indica el límite entre el tejido que penetra en el implante y la región sin penetración

Fig. 6b



--- indica el contorno del implante, e ... indica el límite entre el tejido que penetra en el implante y la región sin penetración

Fig. 7

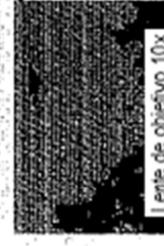
Tejido no tejido	Porosidad del tejido no tejido (%)	Porosidad de las fibras del tejido no tejido (%)	Vista en sección transversal (trozo de tejido teñido con HE) "◁" indica la superficie más superior del tejido no tejido	Distancia de infiltración celular máxima
Tejido no tejido A sin material protésico óseo	78.3	78.3		41 μm
Tejido no tejido tridimensional B	83.5	91.7		146 μm
Tejido no tejido tridimensional C	92.5	98.6		376 μm
Tejido no tejido tridimensional D	94.8	99.2		580 μm

Fig. 8

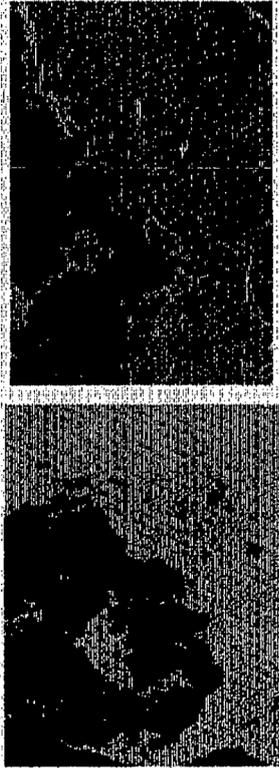
	Tamaño de poro ( $\mu\text{m}$ )	Infiltración celular (trozo de tejido teñido con HE)  Imágenes correspondientes a 2 partes de cada material textil	(Evaluación)
Tejido no tejido tridimensional $\beta$	8.8		Buena
Tejido no tejido tridimensional $\gamma$	16.0		Superior

Fig. 9

Marcar la fibra en la vista en sección transversal



(610 × 410 μm)



La distancia interfibra se midió usando el método del centroide (software "A-Zo Kun")

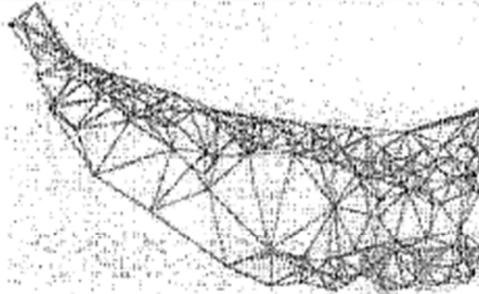
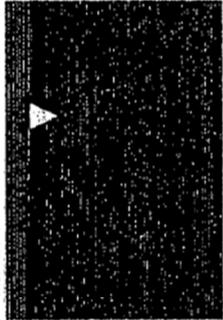
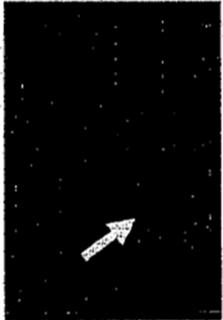
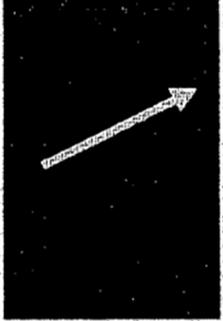


Fig. 10

Infiltración celular (trozo de tejido teñido con HE)	Tejido no tejido (i)	Tejido no tejido (ii)	Tejido no tejido (iii)
<p>la flecha blanca indica la distancia de infiltración celular desde la superficie del tejido no tejido</p> <p>— indica 150 μm</p>	 <p>lente 40x</p>	 <p>lente 20x</p>	 <p>lente 20x</p>
(Evaluación)	Insatisfactoria	Buena	superior
Distancia de infiltración máxima	11.5 μm	143.7 μm	317.0 μm
Tamaño de poro	2.8 μm	11.4 μm	14.7 μm