

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 632**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2016 PCT/NL2016/050633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17048120**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2016 E 16771014 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3349809**

54 Título: **Material compuesto para el relleno de cavidades óseas**

30 Prioridad:

14.09.2015 GB 201516179

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

18.06.2020

73 Titular/es:

**FUJIFILM MANUFACTURING EUROPE B.V.
(100.0%)
Oudenstaart 1
5047 TK Tilburg, NL**

72 Inventor/es:

**KLUIJTMANS, SEBASTIANUS GERARDUS
JOHANNES MARIA;
VAN DONGEN, ELISABETH MARIANNA
WILHELMINA MARIA;
PAWELEC, KENDELL MARLEEN;
KNYCHALA, JONATHAN y
VERDUIJN, DENNIS ADRIANUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 767 632 T3

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

DESCRIPCIÓN

Material compuesto para el relleno de cavidades óseas

La investigación que conduce a estos resultados ha recibido financiación de People Programme (Marie Curie Actions) del Programa Seventh Framework de la Unión Europea FP7/2007-2013 / bajo el acuerdo de subvención REA n° 607051.

La invención se refiere a un composiciones, armazones y a su uso en aplicaciones médicas, incluyendo rellenos para cavidades óseas. Se han utilizado muchos materiales diferentes para el reemplazo de huesos y sustitutos. Sin embargo, los materiales utilizados no se han comportado tan bien como el hueso natural. Estos sustitutos óseos no han sido ideales, porque tienen propiedades mecánicas muy diferentes y a menudo exhiben una biocompatibilidad menos que deseable y, como tales, no ejercen un alto nivel de control sobre el proceso de formación de hueso nuevo.

Uno de los enfoques recientes se describe en el documento WO2007040574, en donde se propone un material nanocompuesto biomimético reticulado que comprende nanocristales de hidroxiapatito, una gelatina natural y un polímero sintético. Como se usa gelatina natural y otro polímero sintético, las capacidades de unión no se controlan fácilmente. Tampoco se prefiere el uso de componentes derivados de animales tales como la gelatina.

Otro enfoque se describe en el documento US8987204, que describe la administración de gelatinas recombinantes específicas solo para inducir la generación de hueso. Este documento guarda silencio sobre el uso concurrente de hidroxiapatito, que se prefiere como material biomimético y reabsorbible para el propósito del armazón y la formación de hueso.

Todavía otro enfoque que utiliza gelatina recombinante se describe en el documento JP201302213, en donde se describen mezclas físicas con fosfatos de calcio. Sin embargo, este documento guarda silencio con respecto a la interacción biomimética beneficiosa entre el fosfato de calcio y la gelatina recombinante y, por lo tanto, no enseña cómo controlar esta interacción. J. Biomed. Mater. Res. 74B(2), agosto de 2005, páginas 686-698 y J. Inorg. Biochem. 101(4), abril de 2007, páginas 686-691 describen materiales compuestos de gelatina e hidroxiapatito, cuya preparación incluye una etapa de co-precipitación. J. Control. Release 109(1-3), 5 de diciembre de 2005, páginas 256-274 enumera varios materiales compuestos entre gelatina e hidroxiapatito para su uso en la regeneración ósea.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un material compuesto que comprende una gelatina recombinante e hidroxiapatito, en el que la gelatina recombinante comprende residuos de ácido glutámico y aspártico que se distribuyen homogéneamente a lo largo de una cadena de gelatina, en donde:

- (i) la gelatina recombinante comprende un total de una cantidad de al menos 8% de ácidos glutámico y/o aspártico por cada 60 aminoácidos en fila con una desviación estándar de a lo sumo 1,6;
- (ii) el hidroxiapatito se obtiene por precipitación en presencia de la gelatina recombinante.

Los materiales compuestos de la presente invención mejoran la eficacia y el control de la formación de hueso, p. ej., por su uso como materiales compuestos biomiméticos para el relleno de cavidades óseas.

Preferiblemente, la desviación estándar (SD_{ED}) es a lo sumo de 1,30, más preferiblemente a lo sumo de 1,10.

La cantidad en % de ácidos glutámico y/o aspártico por cada 60 aminoácidos en fila se puede calcular dividiendo la gelatina recombinante en segmentos, conteniendo cada uno 60 aminoácidos y, comenzando en el extremo N, y sin tener en cuenta el resto, dividiendo el número de residuos de ácido glutámico (E) y/o (preferiblemente "y") de ácido aspártico (D) por 60 y multiplicando la cifra resultante por 100%, calculando luego el promedio de todas las filas completas de 60 en la gelatina recombinante. Por ejemplo, en la primera fila de SEQ ID NO:1 que se muestra más adelante, hay tres E (residuos de ácido glutámico) y tres D (residuos de ácido aspártico) que hacen un total de seis residuos E y D y $((6/60) \times 100 = 10\%$ en total de la cantidad de ácido glutámico y ácido aspártico por 60 aminoácidos en una fila (5% de E + 5% de D). Si se repite este cálculo para todas las filas completas de 60 en SEQ ID NO:1, se logra una cifra de 9,8% de cantidad de GLU + ASP por cada 60 aminoácidos en fila, tal como se muestra en la Tabla 1 que figura más adelante.

Preferiblemente la gelatina recombinante comprende al menos 8% en total de ácido glutámico y ácido aspártico por cada 60 aminoácidos en una fila, más preferiblemente al menos 8% en total de ácido glutámico y ácido aspártico por cada 60 aminoácidos en cada una de las filas completas de 60 aminoácidos de la gelatina recombinante comenzando en el extremo N de la gelatina recombinante.

La desviación estándar (SD_{ED}) puede determinarse como sigue: la cadena de gelatina se divide en segmentos, conteniendo cada uno 60 aminoácidos, comenzando en el extremo N, y sin tener en cuenta el resto. Para cada uno de estos segmentos, se determina la cantidad combinada de ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D) (colectivamente x_i) y se calcula una desviación estándar como sigue:

5
$$SD_{ED} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}, \text{ en donde:}$$

n es el número total de segmentos que contienen 60 aminoácidos en la gelatina;
 x_i es la cantidad combinada de ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D) para cada uno de los segmentos; y

$$\bar{x} = \frac{\sum_i^n x_i}{n}$$

10 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un armazón que comprende un material compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

15 Los compuestos y los armazones de la presente invención ofrecen un alto grado de biocompatibilidad, al tiempo que exhiben una rápida integración con los tejidos y estructuras circundantes. El armazón puede ser cualquier cuerpo de materia que comprenda el material compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención que pueda utilizarse para la ingeniería de tejidos, p. ej., en cultivo de células *in vitro* o implantación *in vivo*. Típicamente, el armazón es un artículo tridimensional conformado. En general, el armazón se puede utilizar como base para que las células se unan.

20 Además del material compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el armazón contiene opcionalmente, además, uno o más ingredientes adicionales, por ejemplo una o más cargas o polímeros, por ejemplo quitosano, colágeno, gelatina, almidón, polilactida (PLA), poliglicólido (PGA), copolímero aleatorio de poli(lactideglicólido) (PLGA), policaprolactona (PCL), poli(óxido de etileno) (PEO) y/o polietilenglicol (PEG), y así sucesivamente. En una realización preferida, el armazón de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención es un armazón reticulado, p. ej., reticulado por tratamiento deshidrotérmico o por tratamiento con un agente reticulante, p. ej., diisocianato de hexametileno o cualquiera de los agentes reticulantes descritos más adelante.

25 En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de preparación de un material compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la co-precipitación de hidroxiapatito y la gelatina recombinante, seguido opcionalmente por la mineralización a un pH entre 7,0 y 9,0.

30 El método para producir los armazones del segundo aspecto de la presente invención comprende preferiblemente obtener hidroxiapatito por precipitación en condiciones acuosas en presencia de la gelatina recombinante definida en el primer aspecto de la presente invención, la conformación y después el secado del precipitado para formar un armazón y, opcionalmente, reticular el armazón, p. ej., por tratamiento deshidrotérmico o por tratamiento con un agente reticulante químico (p. ej., tal como se describe arriba).

35 La precipitación en condiciones acuosas puede ser provocada, por ejemplo, mezclando en condiciones acuosas hidróxido de calcio, ácido fosfórico y la gelatina recombinante definida en el primer aspecto de la presente invención.

40 En un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un método de utilizar un compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención (p. ej., en forma de un material nanocompuesto biomimético), p. ej., en la terapia de regeneración ósea. El uso comprende preferiblemente implantar el material compuesto de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, el armazón de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención o un artículo que comprende el armazón de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención, en un cuerpo humano o animal.

En este cuarto aspecto de la presente invención, preferiblemente el armazón es un armazón reticulado.

45 Los detalles de una o más realizaciones de la presente invención se recogen en los dibujos adjuntos y la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

La expresión "que comprende" debe interpretarse como que especifica la presencia de las partes, etapas o componentes declarados, pero no excluye la presencia de una o más partes, etapas o componentes adicionales.

La referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa generalmente "al menos uno".

5 Mientras que a menudo el término 'colágeno' o similares se utiliza también en la técnica, el término 'gelatina' se utilizará en el resto de esta descripción. La gelatina natural es una mezcla de polímeros individuales con pesos moleculares que varían desde 5.000 hasta más de 400.000 dalton.

10 "Gelatina", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier gelatina, o a cualquier molécula que tenga al menos una característica estructural y/o funcional de la gelatina. "Gelatina" incluye una sola cadena de colágeno, cualesquiera fragmentos, derivados, oligómeros, polímeros y subunidades de los mismos, que contiene al menos un dominio colagenoso (región Gly-Xaa-Yaa, en donde Xaa y Yaa son independientemente cualquier aminoácido). El término "gelatina" incluye secuencias modificadas por ingeniería genética que no se encuentran en la naturaleza, p. ej., secuencias de colágeno alteradas, p. ej., una secuencia de colágeno que se altera, a través de deleciones, adiciones, sustituciones u otros cambios, de una secuencia de colágeno natural. La expresión "gelatina recombinante" y el término "gelatina" se utiliza indistintamente.

15 El término "secuencia RGD" y "motivo RGD" se utilizan indistintamente.

Los términos "proteína" o "polipéptido" o "péptido" se utilizan indistintamente y se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo de acción específico, tamaño, estructura tridimensional u origen.

20 El término "biomimético" se utiliza para describir el comportamiento multi-fásico y las propiedades del material y soluciones en relación con regenerar la formación de hueso natural, inspirándose en la naturaleza.

La invención se describirá para fines de ilustración solamente en relación con determinadas realizaciones preferidas; sin embargo, se reconoce que las personas expertas en la técnica pueden realizar diversos cambios, modificaciones, adiciones y mejoras en las realizaciones ilustradas, todo ello dentro del espíritu y alcance de la invención.

25 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1: espectro XRD de un material compuesto de acuerdo con la presente invención (muestra 1c descrita en los Ejemplos que figuran más adelante (microesferas compuestas de gelatina/hidroxiapatito ("HA") que comprenden HA altamente amorfo) frente a la muestra 1g (microesferas compuestas de gelatina/HA que comprenden HA que era más cristalino que en el Ejemplo 1c). Tanto en la muestra 1c como en la 1g, el HA se obtuvo por precipitación en presencia del RCP.

30 Fig. 2: Imágenes SEM de muestras compuestas muestra 1c (= a) y 1g (= b) en forma de microesferas.

Fig. 3: Imágenes SEM de secciones transversales a través de muestras compuestas 1b5, 1b4 y 1b3 descritas en los Ejemplos. Estas muestras son armazones de la presente invención en forma de esponjas porosas anisotrópicas que comprenden el material compuesto del primer aspecto de la presente invención. Las imágenes superiores son secciones en una dirección transversal a la dirección de los poros y las imágenes inferiores son secciones en una dirección longitudinal a la dirección de los poros.

35 Fig. 4: Espectros FTIR de muestras compuestas 1c (en dos concentraciones) y 1p.

40 La gelatina recombinante es preferiblemente una gelatina no fibrilar y preferiblemente tiene un peso molecular menor que la gelatina normal, nativa. Además de ello, la gelatina recombinante se caracteriza, además, porque comprende residuos de ácido glutámico y/o aspártico distribuidos homogéneamente a lo largo de la cadena.

La gelatina recombinante comprende una cantidad total de al menos 8% de ácidos glutámico y/o aspártico, p. ej., por cada 60 aminoácidos en una fila, con una desviación estándar de a lo sumo 1,6. Con el fin de aumentar la capacidad de unión del HA total, la aparición absoluta de residuos de ácido glutámico y/o aspártico es preferiblemente al menos 9%, más preferiblemente aproximadamente 10%.

45 La gelatina recombinante tiene preferiblemente un peso molecular promedio de menos de 150 kDa, preferiblemente de menos de 100 kDa. Preferiblemente, la gelatina recombinante tiene un peso molecular promedio de al menos 5 kDa, preferiblemente de al menos 10 kDa y más preferiblemente de al menos 30 kDa. Los intervalos de pesos moleculares promedios preferidos para la gelatina recombinante incluyen 50 kDa a 100 kDa, 20 kDa a 75 kDa y 5 kDa a 40 kDa. Se pueden preferir pesos moleculares más bajos cuando se requieren mayores concentraciones en masa de gelatinas debido a la menor viscosidad.

50

La gelatina recombinante se puede obtener comercialmente, p. ej., de FUJIFILM bajo el nombre comercial Cellnest™. La gelatina recombinante también se puede preparar, p. ej., por métodos conocidos, por ejemplo, tal como se describe en las solicitudes de patente EP 0 926 543 EP1014176. metodología para preparar gelatinas recombinantes también se describe en la publicación 'High yield secretion of recombinant gelatins by Pichia pastoris', M. W. T. Werten et al., Yeast 15, 1087-1096 (1999). Gelatinas recombinantes adecuadas también se describen en el documento WO 2004/85473.

En una realización, la gelatina recombinantes comprende al menos dos residuos de lisina, siendo dichos residuos de lisina residuos de lisina en los extremos, en donde un primer residuo de lisina en el extremo es el residuo de lisina que está más próximo al extremo N de la gelatina y el segundo residuo de lisina en el extremo es el residuo de lisina que está más próximo al extremo C de la gelatina y dichos residuos de lisina en los extremos están separados por al menos un 25 por ciento del número total de aminoácidos en la gelatina. Gelatinas recombinantes de este tipo se pueden obtener, por ejemplo, mediante los métodos descritos en el documento US 2009/0246282.

En una realización preferida, la gelatina recombinante tiene excelentes propiedades de unión celular y, preferiblemente, no muestra riesgos relacionados con la salud. Ventajosamente, esto se logra utilizando una gelatina recombinante enriquecida con RGD, p. ej., una gelatina recombinante en la que el porcentaje de motivos RGD relacionados con el número total de aminoácidos es al menos 0,4. Si la gelatina enriquecida en RGD comprende 350 aminoácidos o más, cada uno de los segmentos de 350 aminoácidos contiene preferiblemente al menos un motivo RGD. Preferiblemente, el porcentaje de motivos RGD es al menos 0,6, más preferiblemente al menos 0,8, más preferiblemente al menos 1,0, más preferiblemente al menos 1,2 y lo más preferiblemente al menos 1,5. Un porcentaje de motivos RGD de 0,4 corresponde a al menos 1 secuencia RGD por cada 250 aminoácidos. El número de motivos RGD es un número entero, por lo tanto, para cumplir con la característica del 0,4%, una gelatina que consiste en 251 aminoácidos debe comprender al menos 2 secuencias RGD. Preferiblemente, la gelatina recombinante enriquecida en RGD comprende al menos 2 secuencias RGD por cada 250 aminoácidos, más preferiblemente al menos 3 secuencias RGD por cada 250 aminoácidos, lo más preferiblemente al menos 4 secuencias RGD por cada 250 aminoácidos. En una realización adicional, una gelatina enriquecida en RGD comprende al menos 4 motivos RGD, preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 8, incluso más preferiblemente al menos 12 hasta e incluyendo 16 motivos RGD.

Las gelatinas recombinantes utilizados en esta invención se derivan preferiblemente de secuencias colágenas. Las secuencias de ácido nucleico que codifican colágenos se han descrito generalmente en la técnica. (Véase, p. ej., Fuller y Boedtker (1981) Biochemistry 20: 996-1006; Sandell et al. (1984) J Biol Chem 259: 7826-34; Kohno et al. (1984) J Biol Chem 259: 13668-13673; French et al. (1985) Gene 39: 311-312; Metsaranta et al. (1991) J Biol Chem 266: 16862-16869; Metsaranta et al. (1991) Biochim Biophys Acta 1089: 241-243; Wood et al. (1987) Gene 61: 225-230; Glumoff et al. (1994) Biochim Biophys Acta 1217: 41-48; Shirai et al. (1998) Matrix Biology 17: 85-88; Tromp et al. (1988) Biochem J 253: 919-912; Kuivaniemi et al. (1988) Biochem J 252: 633640; y Ala-Kokko et al. (1989) Biochem J 260: 509-516).

Gelatinas recombinantes enriquecidas en motivos RGD también se pueden preparar mediante, por ejemplo, los métodos generales descritos en el documento US 2006/0241032.

Cuando el material compuesto o armazón está destinado a un uso médico o farmacéutico, la gelatina recombinante tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos que está estrechamente relacionada con o es idéntica a la secuencia de aminoácidos de un colágeno humano natural. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la gelatina comprende secuencias de aminoácidos repetidas que se encuentran en el colágeno humano nativo, especialmente una secuencia que comprende un motivo RGD (con el fin de crear una gelatina recombinante enriquecida en RGD). El porcentaje de motivos RGD en una secuencia seleccionada de este tipo depende de la longitud elegida de la secuencia seleccionada y la selección de una secuencia más corta inevitablemente daría como resultado un mayor porcentaje de RGD en la gelatina recombinante final. El uso repetitivo de una secuencia de aminoácidos seleccionada se puede utilizar para proporcionar una gelatina recombinante que tenga un peso molecular más alto que la gelatina nativa. Además, la gelatina recombinante es preferiblemente no antigénica y está enriquecida con RGD (en comparación con las gelatinas nativas).

Así, en una realización preferida, la gelatina recombinante comprende una parte de una secuencia de colágeno humano nativo. Preferiblemente, la gelatina recombinante es una gelatina enriquecida en RGD que comprende (o que consiste en) al menos 80% de una o más partes de una o más secuencias de aminoácidos de gelatina humana nativa. Preferiblemente, cada una de estas partes de secuencias de gelatina humana tiene una longitud de al menos 30 aminoácidos, más preferiblemente al menos 45 aminoácidos, lo más preferiblemente al menos 60 aminoácidos, hasta, p. ej., 240, preferiblemente hasta 150, lo más preferiblemente hasta 120 aminoácidos, conteniendo cada una de las partes preferiblemente una o más secuencias RGD. Preferiblemente, la gelatina enriquecida en RGD comprende (o consiste en) una o más partes de una o más secuencias de colágeno humano nativo.

Un ejemplo de una fuente adecuada de gelatina recombinante que puede utilizarse en el método de esta invención es COL1A1-1 humano. Una parte de 250 aminoácidos que comprende una secuencia RGD se da en el documento WO 04/85473. Las secuencias de RGD en la gelatina recombinante pueden adherirse a receptores específicos en las superficies celulares denominadas integrinas.

5 Gelatinas enriquecidas con RGD se pueden producir por métodos recombinantes descritos, por ejemplo, en los documentos EP-A-0926543, EP-A-1014176 o WO 01/34646, especialmente en los Ejemplos de las dos primeras publicaciones de patente mencionadas. El método preferido para producir una gelatina recombinante enriquecida con RGD comprende comenzar con una secuencia de ácido nucleico natural que codifica una parte de la proteína colágeno que incluye una secuencia de aminoácidos de RGD. Repitiendo esta secuencia, se puede obtener una
10 gelatina recombinante enriquecida con RGD.

Por lo tanto las gelatinas recombinantes se pueden producir por expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica este tipo de gelatinas por un microorganismo adecuado. El procedimiento puede llevarse a cabo adecuadamente con una célula fúngica o una célula de levadura. De manera adecuada, la célula huésped es una célula huésped de alta expresión, tal como Hansenula, Trichoderma, Aspergillus, Penicillium, Saccharomyces,
15 Kluyveromyces, Neurospora o Pichia. Las células fúngicas y de levadura son preferibles a las bacterias, ya que son menos susceptibles a la expresión inadecuada de secuencias repetitivas. Lo más preferiblemente, el huésped no tendrá un alto nivel de proteasas que escindan la estructura de gelatina que se está expresando. A este respecto, Pichia o Hansenula ofrecen un ejemplo de un sistema de expresión muy adecuado. El uso de Pichia pastoris como sistema de expresión se describe en los documentos EP 0 926 543 y EP 1 014 176. El microorganismo puede estar
20 libre de un mecanismo de procesamiento post-traducciona activo, tal como, en particular, la hidroxilación de prolina y también la hidroxilación de lisina. Alternativamente, el sistema huésped puede tener una actividad de hidroxilación de prolina endógena mediante la cual la gelatina se hidroxila de una manera altamente efectiva.

En una realización adicional, la gelatina recombinante tiene menos glicosilación que la gelatina nativa, p. ej., una glicosilación de menos de 2 % en peso, preferiblemente menos de 1 % en peso, más preferiblemente menos de 0,5 % en peso, especialmente menos de 0,2 % en peso y más especialmente menos de 0,1 % en peso. En una
25 realización preferida, la gelatina recombinante está libre de glicosilación.

El grado o % en peso de glicosilación se refiere al peso total de hidratos de carbono por unidad de peso de la gelatina, tal como se determina, por ejemplo, mediante MALDI-TOF-MS (siglas inglesas de espectrometría de masas por desorción láser de ionización asistida por matriz) o por el método de titulación de Dubois. El término 'glicosilación'
30 se refiere no solo a los monosacáridos, sino también a los polisacáridos, p. ej., los di-, tri- y tetra-sacáridos.

Existen diversos métodos para asegurar que la glucosilación sea baja o esté ausente. La glucosilación es una modificación post-traducciona, por la cual los hidratos de carbono se unen covalentemente a determinados aminoácidos de la gelatina. Así, tanto la secuencia de aminoácidos como la célula huésped (y enzimas, especialmente glucosiltransferasas) en las que se produce la secuencia de aminoácidos determinan el grado de
35 glucosilación. Hay dos tipos de glucosilación: la N-glucosilación comienza con el enlace de GlcNAc (N-actilglucosamina) al grupo amida de asparaginas (N o Asn) y la O-glucosilación comúnmente enlaza GalNAc (N-acetilgalactosamina) al grupo hidroxilo del aminoácido serina (S o Ser) o treonina (T o Thr).

La glucosilación puede, por lo tanto, ser controlada y especialmente reducida o prevenida, eligiendo un huésped de expresión apropiado, y/o modificando o eligiendo secuencias que carecen de sitios de consenso reconocidos por las glucosiltransferasas del huésped. La síntesis química de gelatina también se puede utilizar para preparar gelatina
40 que esté libre de glucosilación. También la gelatina recombinante que comprende glucosilación puede tratarse después de la producción para separar todos o la mayoría de los hidratos de carbono, o la gelatina no glicosilada puede separarse de la gelatina glicosilada utilizando métodos conocidos.

Cristales de hidroxiapatito pueden formarse mediante la combinación de fuentes de calcio y fosfato y permitiendo la precipitación. A diferencia de la nucleación homogénea para la que la nucleación tiene lugar aleatoriamente en solución, se forma hidroxiapatito heterogéneamente nucleado mediante la asociación inicial de los iones calcio con grupos ácido carboxílico del ácido aspártico y/o grupos ácido glutámico en la gelatina recombinante. Estos cristales pueden crecer e incrustarse aún más en la estructura de la matriz y, con ello, imitar la naturaleza del hueso humano, en donde el colágeno y el hidroxiapatito están íntimamente enlazados.
45

Sorprendentemente, los autores de la invención encontraron que las gelatinas recombinantes descritos en el primer aspecto de la presente invención dan lugar a la nucleación y el crecimiento de cristales de hidroxiapatito de baja cristalinidad que se asocian a los grupos ácidos carboxílicos de una manera biomimética (o proceso de biomineralización) que se prefiere en términos de reabsorbibilidad y formación incrementada de hueso.
50

Las gelatinas recombinantes definidas en el primer aspecto de la presente invención se utilizan ventajosamente, ya que inducen la nucleación mineral eficiente del hidroxiapatito que permite una mayor capacidad de unión mineral. Preferiblemente, la desviación estándar mencionada anteriormente es a lo sumo de 1,3, más preferiblemente a lo sumo de 1,1.

- 5 Compuestos de gelatina recombinante de hidroxiapatito se pueden preparar utilizando métodos descritos en la bibliografía para la preparación de materiales compuestos de colágeno/hidroxiapatito, por ejemplo, según se describe por S. Sprio *et al* en Journal of Nanomaterials, Volumen 2012, Artículo ID418281.

10 Se puede precipitar hidroxiapatito en presencia de la gelatina recombinante definida en el primer aspecto de la presente invención, por ejemplo, disolviendo la gelatina recombinante en una solución acuosa a una concentración típicamente entre 1% y 30%, acidificando la solución utilizando ácido fosfórico y mezclando esta solución con hidróxido de calcio, p. ej., añadiendo la solución de gelatina recombinante acidificada a una solución de hidróxido de calcio. También es posible mezclar primero la gelatina recombinante con una fuente de calcio (p. ej., solución de hidróxido de calcio) y posteriormente añadir el ácido fosfórico.

15 Después de la precipitación del hidroxiapatito en presencia de la gelatina recombinante (típicamente permitiendo que se produzca un proceso de cristalización en presencia de la gelatina recombinante) se obtiene habitualmente una suspensión compuesta. La suspensión puede procesarse adicionalmente, si se desea, moldeando y secando. De esta manera se puede formar un armazón. Ejemplos de procesos de conformación y secado incluyen emulsificación, secado por pulverización, moldeo, templado con hielo o liofilización. Dependiendo del procesamiento, se puede formar un armazón, p. ej., un armazón poroso o no poroso. Los armazones en forma de microesferas son particularmente preferidos, ya que pueden utilizarse para formar rellenos de huesos inyectables. Las microesferas pueden variar en tamaño y preferiblemente tienen un diámetro entre 1 y 2000 μm , p. ej., se prefieren armazones en forma de microesferas que tengan un diámetro promedio de entre 1 y 2000 μm . Preferiblemente, las microesferas son de un tamaño que permite la inyección en el sujeto que necesita regeneración ósea, p. ej., los armazones preferidos están en forma de microesferas que tienen un diámetro promedio de 10 a 200 μm , p. ej., 10, 30, 100 o 200 μm de diámetro.

20 También se prefiere el uso de técnicas de templado con hielo, tal como se describe en el documento WO2013068722, que permite la formación de armazones que tienen orientaciones de poro anisotrópicas. Los tamaños de poro anisotrópicos son preferiblemente de 1 a 1000 μm de diámetro. Preferiblemente, los tamaños de poro son lo suficientemente grandes como para permitir la penetración en la célula, es decir, al menos 10, 30, 100 μm de diámetro. Más preferiblemente, el armazón comprende poros de al menos 150 μm (promedio) de diámetro. Preferiblemente, el tamaño de poro (promedio) del armazón es inferior a 500 μm de diámetro, más preferiblemente inferior a 450 μm .

25 El armazón tiene opcionalmente una distribución monodispersa o polidispersa del tamaño de los poros. Para el análisis del tamaño de los poros se toman preferiblemente al menos tres micrografías SEM de cada uno de los armazones. Se puede utilizar el software ImageJ (ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes Java de dominio público), delineando y luego midiendo poros individuales; el tamaño de los poros es preferiblemente el diámetro promedio de Feret de al menos 40 poros.

30 Para imitar la composición del hueso natural, los materiales compuestos y los armazones de la presente invención comprenden preferiblemente una relación de hidroxiapatito a la gelatina recombinante entre 100:1 y 1:100, más preferiblemente entre 10:1 y 1:10 e incluso más preferiblemente entre 5:1 y 1:5. La relación más preferible del hidroxiapatito a la gelatina recombinante es 3:2 a 2:3. Al seleccionar la relación, se puede lograr una buena estabilidad del material compuesto sin sacrificar las señales químicas proporcionadas por el hidroxiapatito.

35 Para aumentar el carácter biomimético de los materiales compuestos y los armazones de la presente invención, el hidroxiapatito puede comprender, además, aditivos tales como iones CO_3^{2-} , Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , SiO_4^{4-} y/o HPO_4^{2-} . En una realización, los materiales compuestos y los armazones de la presente invención comprenden uno o más de este tipo de aditivos en una cantidad total de 0,01% a 25% en peso. Se prefieren especialmente concentraciones de aditivos que imitan las cantidades de dichos aditivos en el hueso humano natural.

40 El tamaño preferido de los materiales compuestos y los armazones de la presente invención depende de la aplicación en la que se ha de utilizar el material compuesto. Por ejemplo, el tamaño promedio de los materiales compuestos y los armazones porosos puede variar, por ejemplo, tan pequeño como 1 mm por 1 mm con un grosor de 1 mm hasta tan grande como 10 cm por 10 cm con un grosor de 1 cm.

45 Para obtener un tiempo de permanencia del material compuesto que permita la regeneración completa del hueso, preferiblemente los materiales compuestos y los armazones de la presente invención están reticulados.

Preferiblemente, la regeneración del hueso y la resorción del material compuesto es un proceso simultáneo. La reticulación se logra preferiblemente utilizando grupos reactivos presentes en la gelatina recombinante. Las posibles formas de reticular polipéptidos ya se describen ampliamente en la bibliografía. La reticulación se produce principalmente a través del ácido carboxílico o grupos amina de la gelatina.

5 El agente reticulante que puede utilizarse en la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede utilizar un agente reticulante químico, p. ej., formaldehído, glutaraldehído, diisocianato de hexametileno, carbodiimidias y/o cianamida.

10 Preferiblemente, los métodos de reticulación utilizados no alteran la biocompatibilidad del material compuesto o armazón y no generan una respuesta inmune fuerte. A ese respecto, se prefiere el uso del tratamiento deshidrotérmico como método de reticulación. También el uso de diisocianato de hexametileno se prefiere como agente reticulante.

15 Los materiales compuestos y los armazones de la presente invención comprenden opcionalmente, además, excipientes que proporcionan una formulación de relleno óseo que además estimula el proceso de formación del hueso. Ejemplos de excipientes de este tipo incluyen polímeros sintéticos y naturales, fármacos, factores de crecimiento, reticulantes, hueso natural y componentes inorgánicos (p. ej., fosfatos de calcio que tienen otras estructuras cristalinas, fosfato tricálcico, etc.).

20 Los materiales compuestos y los armazones de la presente invención son particularmente útiles en el campo de la regeneración del hueso, p. ej., para rellenar defectos de los huesos humanos formados por enfermedades o por trauma. Dependiendo del sitio y del método de aplicación, la composición del material compuesto o armazón puede necesitar ser ajustada.

El material compuesto y el armazón están preferiblemente en forma de una composición con otros ingredientes o en forma de una microesfera, partícula o esponja. Se pueden utilizar diversos tamaños y formas para el material compuesto y el armazón apropiados para el defecto del hueso en el que se colocarán.

25 El material compuesto está opcionalmente en forma de una pasta inyectable o una masilla, especialmente cuando se utiliza para rellenar un defecto del hueso de forma irregular.

30 Cuando se utilizan los materiales compuestos y los armazones de la presente invención como un material de relleno de los huesos, se les puede utilizar en unión con otras técnicas ortopédicas para estabilizar defectos de los huesos, por ejemplo en unión con placas y tornillos. Los materiales compuestos y los armazones se pueden mezclar con un fluido corporal antes de la aplicación como relleno óseo, p. ej., un fluido corporal tal como sangre, plasma sanguíneo o aspirado de médula ósea.

La invención se ilustrará ahora mediante Ejemplos no limitantes en los que todas las partes y los porcentajes son en peso a menos que se especifique lo contrario.

EJEMPLOS

Preparación de Gelatinas Recombinantes

35 Se prepararon gelatinas recombinantes (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6) a base de una secuencia de ácido nucleico que codifica una parte de la secuencia de aminoácidos de la gelatina de COL1A1-I humano y se modificó esta secuencia de ácido nucleico utilizando los métodos descritos en los documentos EP-A-0926543, EP-A-1014176 y WO01/34646. Las gelatinas no contenían hidroxiprolina y comprendían las secuencias de aminoácidos identificadas en esta memoria como en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Las secuencias 1 a 5 tienen la misma composición global de aminoácidos y difieren en la distribución de los residuos de ácido glutámico (GLU) y aspártico (ASP). Excepto por la última fila incompleta, la cantidad total de GLU + ASP por fila de 60 aminoácidos se muestra en el lado derecho de cada una de las filas.

SEQ ID NO : 1 :

número de residuos (GLU + ASP) por cada 60 aminoácidos en una fila:

GAPGAPGLQGAPGLQGMPPERGAAGLPGPKGERGDAGPKGAAGAPGAPGLQGMPPERGAA 4
 GLPGPKGERGDAGPKGAAGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGAA 6
 GAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPPGARGADGLPGPKGERGDAGPKGADGAP 5
 GKAGVRGLAGPPGAPGLQGAPGLQGMPPGARGAAGLPGPKGARGDAGPKGAAGAPGAPGLQ 1
 GMPGERGAAGLPGPKGERGDAGPKGAAGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAAGLPGPKGER 6
 GDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPPERGAAGLPGPKGERGDA 6
 GPKGADGAPGKDGVRGLAGPPGAPGLQGAPGLQGMPPERGAAGLPGPKGARGDAGPKGAD 5
 GAPGAPGLQGMPPGARGAAGLPGPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPIGPPGERGAA 5
 GLPGPKGERGDAGPKGAAGAPGKAGVRGLAGPIGPPGPAGAPGAPGLQGMPPERGAAGLPG 3
 GPKGERGDAGPKGADGAPGKDGVRGLAGPPG

5 La distribución de GLU + ASP en la gelatina está representada por la desviación estándar de las cantidades por fila (véase la Tabla 1 que figura más adelante). En las secuencias de aminoácidos utilizadas en los presentes Ejemplos, la desviación estándar aumenta gradualmente de 0,6 para la SEQ ID NO:1 a 1,9 para la SEQ ID NO:5. Además de una desviación estándar alta, la SEQ ID NO:6 también contiene una cantidad menor de residuos de GLU y ASP.

Las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se utilizaron para preparar diversos materiales compuestos y armazones tal como se describe más adelante en los Ejemplos.

Tabla 1: Cantidad/distribución de (GLU + ASP) en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Estructura	% Cantidad de (GLU + ASP)	Número promedio de residuos (GLU + ASP) por cada 60 aminoácidos en una fila	Cantidad de desviación estándar (GLU + ASP) por cada 60 aminoácidos en una fila
Ejemplos de la invención			
SEQ ID NO: 1	9,8	5,9	0,60
SEQ ID NO: 2	9,8	5,9	1,05
SEQ ID NO: 3	9,8	5,9	1,27
Ejemplos Comparativos			
SEQ ID NO: 4	9,8	5,9	1,69
SEQ ID NO: 5	9,8	5,9	1,90
SEQ ID NO: 6	7,6	4,6	1,67

10 **Ejemplo 1)** Preparación de Materiales Compuestos por Precipitación de Hidroxiapatito en Presencia de Gelatinas Recombinantes

15 Por ejemplo 1d una solución de 10 gramos de gelatina (SEQ ID NO:2) por cada 100 gramos de solución se preparó disolviendo la gelatina seca en agua desionizada. Posteriormente se añadió ácido fosfórico (2649 microlitros, 86,2 % en masa). Esta mezcla de carácter ácido se añadió luego gota a gota a 54,9 gramos de una suspensión de hidróxido de calcio que contenía 4,9 gramos de hidróxido de calcio. Los otros ejemplos se prepararon de manera similar de acuerdo con las condiciones de la Tabla 2.

20 En algunos casos, el pH se ajustó después de la precipitación utilizando ácido clorhídrico 1 M y en un caso se dejó sin ajustar (pH 9, ejemplo 1g). La reacción de mineralización se dejó luego continuar durante 2 horas en condiciones ambientales. Dependiendo de las cantidades añadidas de ácido fosfórico e hidróxido de calcio en comparación con la gelatina, se formaron materiales compuestos que tienen diversas relaciones de gelatina a HA. Ejemplos de condiciones de mineralización utilizadas para los ejemplos de la invención SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y para los Ejemplos Comparativos SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 se muestran en la Tabla 2. Además, la muestra de referencia 1p mostrada en la Tabla 2 que figura a continuación también es un Ejemplo Comparativo. Esta suspensión se obtiene mezclando polvo de fosfato de calcio (obtenido de Sigma-Aldrich) en una solución de gelatina en las condiciones mostradas en la Tabla 2. Por lo tanto, la muestra 1p es una mezcla física de fosfato de calcio y gelatina, en la cual el fosfato de calcio no se precipita en presencia de la gelatina. Este enfoque de mezcla física se describe en el documento JP2013202213.

Tabla 2: Preparación de Materiales Compuestos

	gelatina	concentración de gelatina (% en masa)	pH de la reacción de mineralización	Relación gelatina a hidroxiapatito
1a	SEQ ID NO: 2	2	7,2	60/40
1b	SEQ ID NO: 2	7,5	7,2	60/40
1c	SEQ ID NO: 2	10	7,2	60/40
1d	SEQ ID NO: 2	10	7,2	40/60
1e	SEQ ID NO: 2	10	7,2	80/20
1f	SEQ ID NO: 2	10	8,0	60/40
1g	SEQ ID NO: 2	10	9,0	60/40
1h	SEQ ID NO: 2	15	7,2	60/40
1i	SEQ ID NO: 2	20	7,2	60/40
1j	SEQ ID NO: 1	10	7,2	60/40
1k	SEQ ID NO: 3	10	7,2	60/40
1l	SEQ ID NO: 4	10	7,2	60/40
1m	SEQ ID NO: 5	10	7,2	60/40
1n	SEQ ID NO: 6	10	7,2	60/40
1p (mezcla física de gelatina y HA-no co-precipitación)	SEQ ID NO: 2	10	7,2	60/40

Ejemplo 2: Formación de armazones

5 Los materiales compuestos obtenidos como suspensiones en el Ejemplo 1 anterior fueron procesados adicionalmente para formar diversos armazones. En lo que sigue, la formación de microesferas (núcleo-envuelta), esponjas isotrópicas y anisotrópicas se describen en los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 2.1 Armazones de Microesferas

10 Muestras de 45 g de aceite de maíz se pre-calentaron a 50°C y se agitó a 500 rpm. Luego se añadieron gota a gota 30 g de cada una de las suspensiones descritas en el Ejemplo 1, en experimentos separados, al aceite de maíz para emulsionar durante 20 minutos hasta obtener un tamaño de partícula promedio ponderado en volumen (D[4,3], Malvern Mastersizer 2000) de aproximadamente 90 µm. Luego, las emulsiones resultantes se enfriaron a 5°C al tiempo que se agitaba y posteriormente se añadieron a 1,3 veces su peso de acetona enfriada rápidamente con hielo bajo agitación para fijar la forma y el tamaño de las microesferas mediante extracción de agua de las partículas gelificadas frías. Las microesferas resultantes se lavaron repetidamente con pesos iguales de acetona hasta que las microesferas eran blancas y el sobrenadante transparente e incoloro. Durante cada uno de los lavados con acetona, las microesferas se dejaron sedimentar durante 10 minutos y el sobrenadante se decantó. Las microesferas resultantes se recogieron luego por filtración y se dejaron secar durante la noche a 60°C en una estufa.

20 Posteriormente las microesferas se reticularon por tratamiento deshidrotérmico (48 horas a 160°C bajo vacío). La eficacia de la reticulación se confirmó mediante un ensayo de solubilidad en el que los armazones de microesferas se pusieron en tampón fosfato salino de pH 7,4 a 37°C durante 24 horas. La reticulación también se puede hacer mediante reticulación de diisocianato de hexametileno en etanol (24 horas, 1% HMDIC en etanol).

Ejemplo 2.2 Armazones de Microesferas de Núcleo-Envuelta

25 Suspensiones que contenían materiales compuestos se prepararon tal como se describe en el Ejemplo 1 y se secaron por pulverización utilizando un secador por pulverización Buchi B-290. Las partículas resultantes tenían un tamaño promedio ponderado en volumen (D[4,3], Malvern Mastersizer 2000) de menos de 20 micrómetros. Antes del procesamiento adicional, estas partículas se reticularon tal como se describe anteriormente en el Ejemplo 2.1. Posteriormente, las partículas reticuladas se dispersaron en una fase acuosa que comprendía gelatina recombinante al 10% y se secaron nuevamente por pulverización. Las partículas resultantes de núcleo-envuelta tenían una envuelta que consistía en gelatina recombinante y contenían una o más partículas del núcleo que comprendían tanto gelatina recombinante como hidroxiapatito en las relaciones descritas en el Ejemplo 1. Finalmente, estas partículas

5 se reticularon nuevamente tal como se describe arriba. En otro experimento, las partículas de gelatina/hidroxiapatito secadas por pulverización con un tamaño de menos de 20 micrómetros se dispersaron en una suspensión de gelatina/hidroxiapatito tal como se obtiene del Ejemplo 1 con una relación de gelatina/hidroxiapatito diferente de la relación de gelatina/hidroxiapatito de las partículas. Después del secado por pulverización y de la reticulación, se obtuvieron partículas de núcleo-envuelta con un núcleo que tenía una relación de gelatina/hidroxiapatito diferente (variable) que la envuelta de las microesferas.

Ejemplo 2.3 Armazones de Esponja Aleatorios o Isotrópicos

10 Las suspensiones de los Ejemplos 1a-1n se vertieron en un recipiente de aluminio revestido con Teflon y se colocaron en un liofilizador pre-enfriado (Zirbus 3x4x5) a -20°C durante 6 horas para permitir una congelación completa. Posteriormente, las muestras se liofilizaron a una presión de 0,05 mbar y una temperatura de -10°C hasta sequedad. La inspección visual y microscópica de las esponjas secas reveló una estructura de esponja isotrópica y aleatoria.

Ejemplo 2.4 Armazones de Esponja Anisotrópica

15 Las suspensiones de los Ejemplos 1b se vertieron en recipientes de aluminio revestidos con Teflon y se sometieron a un método de perfil de congelación tal como se describe en el documento WO2013068722 para obtener esponjas anisotrópicas. Después de la congelación completa, las muestras se liofilizaron a una presión de 0,05 mbar y una temperatura de -10°C hasta sequedad. Posteriormente, las esponjas se reticularon tal como se describe arriba en el Ejemplo 2.1. Las esponjas secas así obtenidas revelaron una estructura de poros completamente anisotrópica. En un caso especial, la suspensión con una composición del ejemplo 1b se sometieron a diversas pendientes de congelación para afectar al tamaño de los poros. De esta manera, el tamaño de los poros podría ajustarse entre 80 y 20 600 micrómetros tal como se muestra en la Tabla 3. El tamaño de los poros era el diámetro promedio de Feret de al menos 40 poros determinado a partir de 3 imágenes SEM utilizando el software ImageJ. La Tabla 3 también revela el efecto del tamaño de los poros sobre la permeabilidad a los líquidos de las esponjas 1b1 - 1b6.

25 Tabla 3: Efecto de la pendiente de congelación sobre el tamaño de los poros y la permeabilidad a los líquidos de los armazones de esponja anisotrópicos que tienen la composición 1b

Muestra	Pendiente de congelación (°C/minuto)	Tamaño de los Poros (micras)	Permeabilidad del líquido en dirección a lo largo de los poros. (10 ⁻⁸ m ²)
1b1	2	80	No hecha
1b2	1	100	No hecha
1b3	0,5	150	0,25
1b4	0,2	300	0,64
1b5	0,1	450	2,9
1b6	0,05	600	No hecha

30 La permeabilidad a los líquidos se midió después de la reticulación de los armazones de esponja anisotrópica basado en un diseño de cabeza que cae estándar. Los armazones utilizados fueron de 5 mm de diámetro, 10 mm de largo. Antes del ensayo, los armazones se humedecieron previamente con solución salina tamponada con fosfato en vacío. Cada una de las mediciones se repitió tres veces para garantizar que no hubiera burbujas de aire que influyeran en los resultados.

Ejemplo 3: Efecto del tipo de Gelatina sobre la unión y estructura de hidroxiapatito (HA)

35 Para analizar el efecto del tipo de gelatina sobre la unión de hidroxiapatito y su estructura, los armazones de microesferas de hidroxiapatito de gelatina obtenidos en el Ejemplo 2.1 se analizaron por microscopía electrónica de barrido (incluyendo EDX), FTIR, XRD y TGA, tal como se describe a continuación.

Microscopía electrónica de barrido

Armazones de microesferas se fijaron en trozos adhesivos y se recubrieron con una capa de platino de 10 nm de espesor. Se obtuvieron imágenes de los armazones de microesferas utilizando un Microscopio Electrónico de

Barrido por Emisión de Campo Jeol JSM-6335F. La formación de imágenes se llevó a cabo a una tensión de 5 kV, con un aumento que varía de x100 a x50 000.
EDX

5 Los armazones de microesferas se embebieron en medio de montaje Leica y secciones transversales de 0,5, 1 y 2 μm de espesor se cortaron con un ultra-micrótomo Ultracut-E de Reichert-Jung. Las secciones transversales se recubrieron con una capa de carbono de 40 nm de espesor y se tomaron imágenes para el mapeo de calcio y fosfato utilizando un detector Oxford INCA X-Max 80 bajo una tensión de 15 kV.

FT-IR

10 Los análisis FT-IR se realizaron utilizando un espectrómetro Frontier FT-IR de PerkinElmer. Los armazones de microesferas se exprimieron en una celda de compresión de diamante y los espectros se adquirieron en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} .

Análisis termogravimétrico (TGA)

15 Se realizaron análisis TGA utilizando DSC Mettler Toledo 823e equipado con un controlador de gas GC10. Los experimentos se realizaron en aire y el peso de la muestra estaba comprendido entre 8 y 12 mg. El calentamiento se realizó en un crisol de alúmina de 70 μL a una tasa de 10°C/min hasta 800°C.

Difracción de rayos X

Patrones de difracción de rayos X (XRDs) se registraron mediante un instrumento Bruker AXS D8 Advance en modo de reflexión (radiación Cu-K α). Las muestras se molieron a través de un aparato de molienda criogénica para obtener un polvo de tamaño de partícula relativamente uniforme.

20 Resultados

25 La XRD demostró que la etapa de precipitación de la presente invención dio como resultado la formación de fosfato de calcio en forma de hidroxiapatito, que ha demostrado ser favorable para la formación de hueso. Como ejemplo, el espectro XRD de la composición 1c se muestra en la Fig. 1. El hidroxiapatito se identifica por la forma característica de los picos en 26 y 32 2θ . La pequeña nitidez del hombro en el triplete manchado a 32 2θ (véase el asterisco en la Fig. 1) es indicativa de la naturaleza poco cristalina del hidroxiapatito en la muestra 1c. La baja cristalinidad potencia la biorresorción del biomaterial compuesto y, por lo tanto, es favorable para la formación de hueso nuevo. En la Tabla 4 se muestra que todos los Ejemplos de la invención tienen un menor grado de cristalinidad que los Ejemplos Comparativos como resultado de su distribución más homogénea de GLU y/o ASP a lo largo de la cadena de gelatina. Además, este hombro es ligeramente más alto cuando no se ajusta el pH (material compuesto 1g, véase la Fig. 1). Los resultados indican, además, que la dirección preferida del ajuste del pH cuando se producen los materiales compuestos de la invención está entre 7 y 9 y aún más preferida entre 7,2 y 8,0.

Tabla 4: Análisis de la cristalización de HA

Estructura	Grado de cristalinidad
Ejemplos de la invención	
1c	Bajo
1g	Bajo
1j	Bajo
1k	Bajo
Ejemplos Comparativos	
1l	Moderado
1m	Moderado
1n	Moderado

El grado de cristalinidad se juzgó a partir de los espectros de XRD tal como se describe arriba.

Con TGA se determinó la relación ponderal de gelatina/hidroxiapatito real de los armazones de microesferas. Los valores medidos eran consistentes con las cantidades de ácido fosfórico e hidróxido de calcio añadido en la reacción de precipitación. Las imágenes SEM en la Fig. 2 muestran la morfología en forma de varilla de los cristales de hidroxiapatito y su agradable incrustación homogénea en la matriz de gelatina para la muestra 1c. El Ejemplo Comparativo 1l (no mostrado) muestra claramente menos incrustación de cristales y más agrupamiento que los ejemplos de la invención. Entre los ejemplos de la invención, la muestra 1g no ajustada al pH mostró la menor incrustación de cristales y la mayor cantidad de agrupamiento (véase la Fig. 2).

Al analizar el desplazamiento de carbonilo en el análisis FTIR es posible identificar las diferencias en la interacción entre la fase orgánica (biomaterial gelatina) y los iones calcio de la fase de hidroxiapatito inorgánica. Cuando no existe una interacción específica entre los grupos carbonilo del ácido glutámico y aspártico y los iones calcio, el pico de carbonilo no se ve afectado en comparación con la referencia en la que solo se añaden iones calcio libres. En la Tabla 5, este desplazamiento de carbonilo se muestra para todas las composiciones con una clara diferencia entre los Ejemplos de la invención y los Ejemplos Comparativos.

La Fig. 4 ilustra el desplazamiento de carbonilo para las muestras 1c y 1p en el espectro FTIR. La composición de referencia 1p de Ca no unida se refiere a una mezcla física de fosfato de calcio y gelatina, en la que el fosfato de calcio no se precipita en presencia de gelatina. Este enfoque de mezcla física se describe en el documento JP2013202213. Como lo evidencia el fuerte desplazamiento del pico de carbonilo, todos los ejemplos de la invención muestran una interacción mucho más fuerte entre el hidroxiapatito o el fosfato de calcio y el carbonilo de la gelatina, apuntando hacia un carácter mucho más biomimético y parecido al hueso natural. Preferiblemente, el desplazamiento de carbonilo del grupo ácido carboxílico en ácido glutámico y aspártico en las microesferas como se observa por FTIR es de al menos 5 cm⁻¹ en comparación con armazones de microesferas que comprenden principalmente fosfato de calcio no unido, más preferiblemente al menos 10 cm⁻¹, lo más preferiblemente al menos 15 cm⁻¹. Además, el ajuste del pH tiene un efecto sobre el desplazamiento de pico observado que muestra el ajuste de pH preferido para la preparación del material compuesto entre 7,0 y 9,0, aún más preferido entre 7,0 y 8,0.

Tabla 5: Desplazamiento del pico de carbonilo como se observa por FTIR como indicación para la unión de Ca

Composición	pH	Posición pico COO (cm ⁻¹)
1a-1e	7,2	1406
1f	8,0	1400
1g	9,0	1397
1h	7,2	1404
1i	7,2	1405
1j	7,2	1403
1k	7,2	1401
1l	7,2	1390
1m	7,2	1391
1n	7,2	1390
1p (mezcla física de gelatina y HA - no coprecipitación)	No aplicable	1388

En resumen, los análisis anteriores indican que la distribución de GLU y/o ASP en la estructura de la gelatina es muy importante para la unión del hidroxiapatito a la gelatina. La distribución de GLU y/o ASP influye en la cristalinidad y la incrustación de cristales y en la unión de los cristales resultantes a la matriz de gelatina orgánica. La mejor interacción, que resultó en el biomaterial compuesto más biomimético se obtuvo utilizando gelatinas en las que los aminoácidos GLU y/o ASP se distribuyen homogéneamente a lo largo de la cadena de aminoácidos. En particular, la interacción biomimética es mejor para gelatinas que tienen una desviación estándar de a lo sumo 1,6, preferiblemente a lo sumo 1,3. Además, se ha demostrado que el pH durante la reacción de precipitación es otro aspecto que es importante para afectar las interacciones entre gelatina e hidroxiapatito.

Ejemplo 5: Cultivo celular en Armazones de Microesferas

Células C2C12 (células del músculo de fibroblastos de ratón CRL-1772 de la ATCC) se cultivaron en condiciones rutinarias a 37°C y 5% de CO₂ hasta un 60% de confluencia en medio DMEM (medio de Eagle modificado por

Dulbecco de Invitrogen) suplementado con Suero Bovino Fetal (FBS) al 10% (Sigma) y solución de Penicilina-Estreptomicina al 1% x100 (Sigma). Las microesferas tal como se obtienen en el ejemplo 2.1 y reticuladas por DHT se sembraron en placas de baja unión de 24 pocillos (Costar, Corning) con 2 mL de suspensión de células que contiene 1×10^5 células/mL. La placa se colocó en un agitador orbital a 30 rpm dentro de una incubadora que funciona a 37°C y 5% de CO₂ durante la noche. Después de la siembra, las microesferas se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato de Invitrogen) con el fin de separar las células no unidas y las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en condiciones estáticas. Para analizar el cultivo celular, las células se tiñeron con el kit Live/Dead de Invitrogen y se tomaron imágenes usando un microscopio óptico Olympus BX60. Las microesferas sembradas se enjuagaron a fondo con PBS y se incubaron con la mezcla Live/Dead (Invitrogen) durante aproximadamente 45 min en la oscuridad. Posteriormente, las microesferas se visualizaron bajo luz fluorescente. Los resultados demuestran que todos los armazones de microesferas de gelatina/hidroxiapatito de la invención son sustratos excelentes para las células.

Ejemplo 6: Cultivo celular en Armazones de Esponja Anisotrópica

Células osteoblásticas MC3T3-E1 (fibroblastos de ratón CRL-2593 de ATTC) se sembraron en armazones anisotrópicos (por ejemplo 2,4 a una densidad de 5×10^5 células por armazón (5 mm de diámetro, 2 mm de altura) utilizando un método de agitador dinámico (los armazones se colocaron en suspensión celular y se hicieron girar a 200 rpm durante 4 horas, luego se transfirieron a placas de cultivo celular en medios de cultivo). Las células se cultivaron después durante 4 semanas en medios de mineralización. Se utilizaron los siguientes armazones (tal como se prepararon en el ejemplo 2.4): 1b3, 1b4, 1b5. Después de 4 semanas, la cantidad de células determinada por cuantificación de ADN (ensayo CyQuant Picogreen) se comparó con la cantidad inicial de células unidas después de 1 día. En la tabla 6 se muestra el cambio porcentual en el número de células. Estos datos demuestran que el tamaño de los poros afecta fuertemente a la tasa de proliferación celular. Basado en la hipótesis de que el crecimiento celular es estimulado por una fuerte difusión de nutrientes, sería de esperar que el tamaño de poro más grande diera la mayor cantidad de células. Sin embargo, los datos implican que existe un óptimo a alrededor de 300 µm y un tamaño de poro de preferencia del material compuesto es igual o superior a 150 µm. Se podría especular que con un tamaño de poro más grande de 450 µm habría menos área de superficie de poro disponible para que proliferaran las células, lo que equilibra el efecto positivo del aumento de la difusión de nutrientes. El intervalo más preferido de tamaño de poro para el cultivo celular, por lo tanto, está entre 100 y 500 µm.

Tabla 6: Efecto del tamaño de poro sobre el cambio porcentual en el número de células desde el día 1 hasta el día 28

Nombre de la muestra	Tamaño de poro (µm)	Cambio porcentual en el número de Células de 1 a 28 días
1b3	150	1600
1b4	300	3250
1b5	450	1900

REIVINDICACIONES

1. Un material compuesto que comprende una gelatina recombinante e hidroxiapatito, en que la gelatina recombinante comprende residuos de ácido glutámico y aspártico que están distribuidos homogéneamente a lo largo de una cadena de gelatina, en donde:
- 5 (i) la gelatina recombinante comprende un total de una cantidad de al menos 8% de ácidos glutámico y/o aspártico por cada 60 aminoácidos en fila con una desviación estándar de a lo sumo 1,6; y
- (ii) el hidroxiapatito se obtiene por precipitación en presencia de la gelatina recombinante.
2. Un material compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el hidroxiapatito se obtiene mediante la reacción de ácido fosfórico e hidróxido de calcio.
- 10 3. Un material compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el hidroxiapatito comprende, además, iones CO_3^{2-} , Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Si^{4+} , Zn^{2+} , SiO_4^{4-} y/o HPO_4^{2-} .
4. Un material compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la relación de hidroxiapatito a gelatina recombinante está entre 100:1 y 1:100.
- 15 5. Un material compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que está en forma de microesferas.
6. Un material compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la microesfera comprende un núcleo y una envuelta.
7. Un material compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la envuelta comprende una relación de gelatina/hidroxiapatito recombinante diferente al núcleo.
- 20 8. Un armazón que comprende un material compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
9. Un armazón de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el material compuesto está en forma de microesferas y el desplazamiento de carbonilo del grupo ácido carboxílico en el ácido glutámico y aspártico en las microesferas como se observa por FTIR es al menos 5 cm^{-1} en comparación con las microesferas que comprenden principalmente fosfato de calcio no unido.
- 25 10. Un armazón de acuerdo con la reivindicación 8 en forma de una esponja anisotrópica porosa.
11. El armazón de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el tamaño de poro de los poros en el material compuesto es de al menos $150\ \mu\text{m}$.
- 30 12. Un método para preparar un material compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la co-precipitación de hidroxiapatito y la gelatina recombinante, opcionalmente seguido de mineralización a un pH entre 7,0 y 9,0.
13. Un material compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un armazón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para uso en la terapia de regeneración ósea.
- 35 14. Un material compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un armazón de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para uso en la terapia de regeneración ósea en combinación con células y/o factores de crecimiento.

Fig. 1

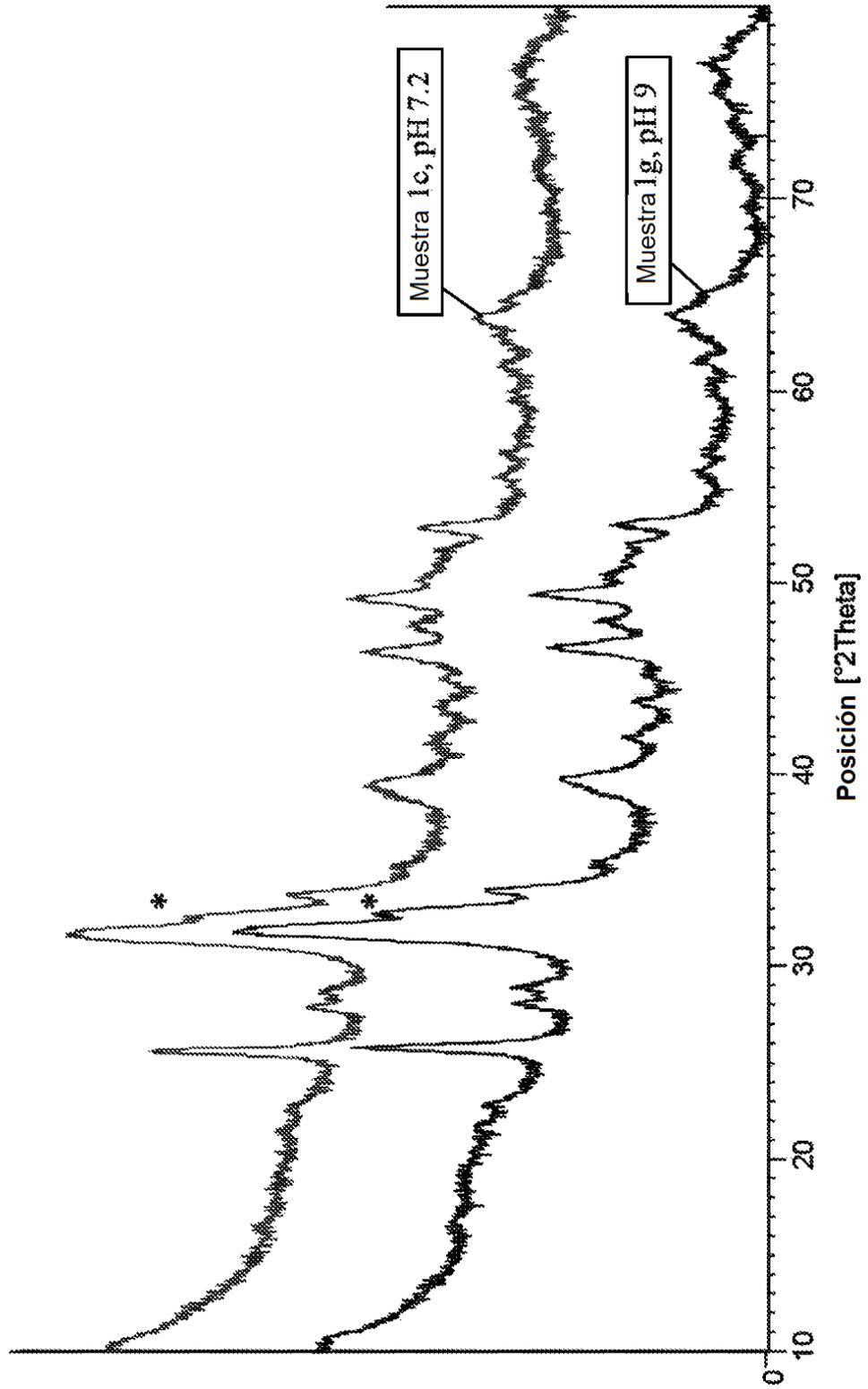


Fig. 3

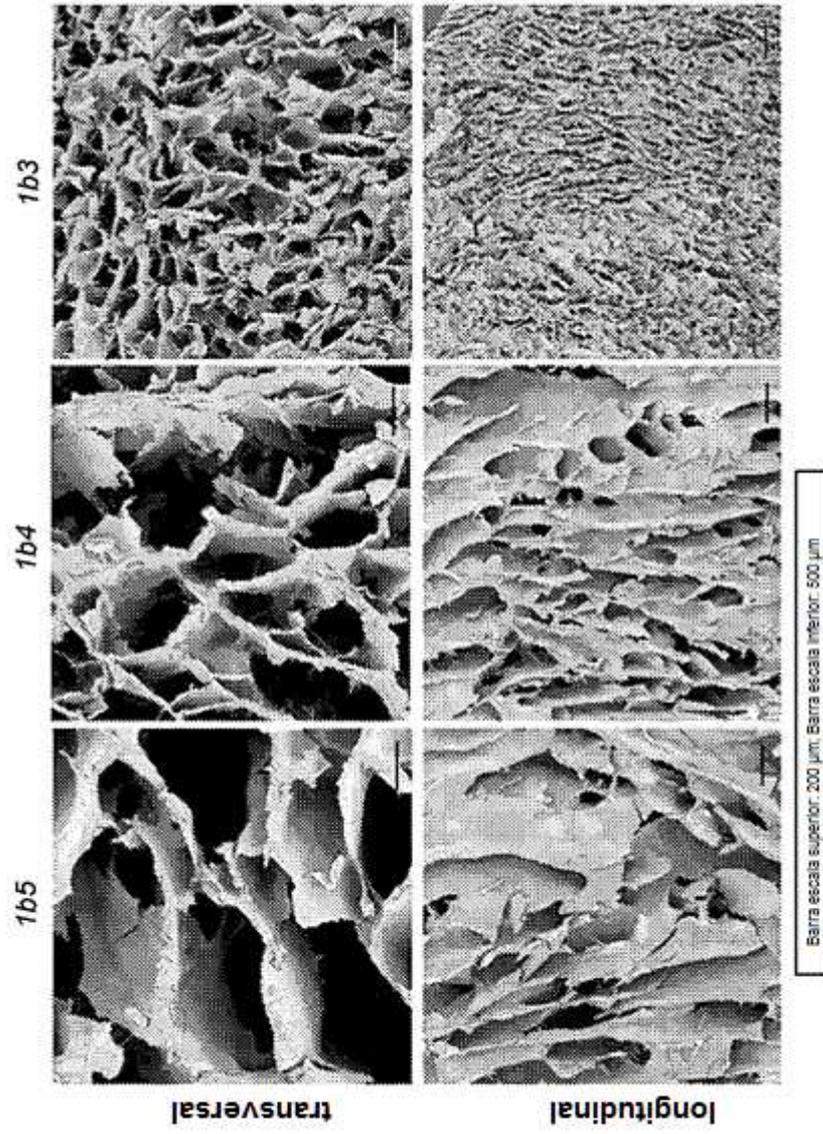


Fig. 4

