

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 976**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/32 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2018 PCT/EP2018/084783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2019 WO19115704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2018 E 18816063 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3544643**

54 Título: **Material sustituto óseo**

30 Prioridad:

14.12.2017 EP 17207235

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

01.02.2021

73 Titular/es:

**GEISTLICH PHARMA AG (100.0%)
Bahnhofstrasse 40
6110 Wolhusen, CH**

72 Inventor/es:

**ZIHLMANN, CLAUDIO y
BUFLER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 803 976 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 sustituto óseo

5 Antecedentes

La invención se refiere a un nuevo material sustituto óseo bifásico con una estructura bicapa basada en fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) que tiene una superficie externa gruesa homogénea, un proceso para la preparación de ese material y el uso del mismo como implante o prótesis para respaldar la formación ósea, la regeneración ósea, la corrección ósea y/o el reemplazo óseo en un sitio defectuoso en un ser humano o animal.

Los defectos en la estructura ósea surgen en una diversidad de circunstancias, tales como trauma, enfermedad y cirugía, y sigue existiendo la necesidad de una corrección eficaz de los defectos óseos en diversos campos quirúrgicos.

15 Se han usado numerosos materiales y composiciones naturales y sintéticos para estimular la curación en el sitio de un defecto óseo. Un material sustituto óseo osteoconductor natural bien conocido que favorece el crecimiento óseo en los defectos óseos periodontales y maxilofaciales es Geistlich Bio-Oss®, disponible en el mercado a través de Geistlich Pharma AG. Ese material se fabrica a partir de hueso natural mediante un proceso descrito en la patente estadounidense n.º 5.167.961, que permite la conservación de la arquitectura trabecular y la estructura nanocristalina del hueso natural, lo que da como resultado una excelente matriz osteoconductor que no se reabsorbe o se reabsorbe muy lentamente.

Se describen sistemas de fosfato de tricalcio/hidroxiapatita (TCP/HAP) y su uso como materiales sustitutos óseos, por ejemplo, en el documento US-6.338.752, que desvela un proceso para la preparación de un cemento bifásico de α -TCP/HAP mediante el calentamiento de una mezcla de polvo de fosfato de amonio y HAP a 1.200-1.500 °C.

La patente europea EP-285826 describe un proceso para la producción de una capa de HAP sobre cuerpos metálicos y no metálicos para implantes mediante la aplicación de una capa de α -TCP y la conversión completa de la capa de α -TCP en HAP mediante la reacción con agua de pH 2 a 7 a 80-100 °C. El producto obtenido es un cuerpo metálico o no metálico cubierto con una capa de HAP.

El documento WO 97/41273 describe un proceso para el recubrimiento de un sustrato, tal como, de manera destacable, hidroxiapatita (HAP) u otros fosfatos de calcio (CAP), con un recubrimiento de hidroxiapatita carbonatada, es decir, hidroxiapatita en donde los iones fosfato y/o hidroxilo se reemplazan parcialmente con iones bicarbonato, mediante un proceso que comprende (a) sumergir el sustrato en una solución de pH 6,8 a 8,0 que contiene iones calcio, iones fosfato e iones bicarbonato a una temperatura inferior a 50 °C, (b) calentar la parte de la solución en contacto con el sustrato hasta una temperatura de 50 a 80 °C hasta que tenga un pH mayor de 8, (c) mantener el sustrato en contacto con la solución alcalina obtenida en la Etapa (b) para formar un recubrimiento de hidroxiapatita carbonatada y (d) sacar el sustrato de la solución y someter el recubrimiento a secado. Se desvela que los iones bicarbonato actúan como inhibidores del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita, lo que da como resultado cristales no estequiométricos que contienen defectos y que tienen dimensiones bastante pequeñas, en concreto, de 10-40 nm de longitud y 3-10 nm de ancho (véase la página 7, líneas 1-7).

Los componentes de los sistemas de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP), especialmente los sistemas de TCP/HAP, difieren en su estabilidad termodinámica. Debido a esta diferencia, cuando los sistemas de CAP/HAP se implantan en un mamífero, en particular, un paciente humano, la solubilidad del TCP y otros fosfatos de calcio es superior en el fluido corporal que la solubilidad de la HAP. La diferencia en cuanto a la solubilidad entre los fosfatos de calcio y la HAP causa una descomposición de la estructura de sinterización desordenada del sistema de CAP/HAP porque el CAP de compuesto mejor soluble (por ejemplo, TCP) se retira más rápido que la HAP. La interconexión sinterizada entre el CAP y la HAP producida a altas temperaturas también contribuirá notablemente a una solubilidad superior del dispositivo en el entorno fisiológico. Dos tipos diferentes de reacciones controlan la degradación *in vivo* acelerada de tales cerámicas: la disolución química y la reabsorción biológica mediante las células. Ambos procesos causan la disolución del material cerámico, lo que causa, además, una sobresaturación local de iones calcio, por lo que hay más iones calcio liberados que iones calcio adsorbidos. El equilibrio natural de los iones calcio ya no existe, ni en la matriz extracelular ni en el tejido que rodea el implante. La alteración local del equilibrio de calcio natural en términos de sobresaturación de iones calcio conduce a una actividad osteoclástica aumentada y, por lo tanto, a una reabsorción acelerada mal controlada del material cerámico y a un riesgo de reacciones inflamatorias adversas, especialmente cuando se usa una gran cantidad de material sustituto óseo sintético.

60 Cuando el material sustituto óseo Geistlich Bio-Oss® se implanta en un paciente humano, el equilibrio de calcio natural prácticamente no se ve afectado, permaneciendo la concentración de iones de calcio sobre la superficie del material y dentro del entorno local del mismo casi constante. Por tanto, la reabsorción biológica del material no tiene lugar o avanza a una velocidad muy lenta sin el riesgo de reacciones inflamatorias adversas.

65 El documento EP-B1-2445543 desvela un material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) altamente ventajoso que, como el material sustituto óseo Geistlich Bio-Oss®, después de ajustarse *in vivo*, permite

que la concentración de iones calcio sobre la superficie del material y dentro del entorno local del mismo permanezca casi constante y, por tanto, no conduce a una actividad osteoclástica aumentada.

5 De hecho, el equilibrio de calcio natural, que es necesario para la regeneración ósea óptima, no se altera ni se destruye. Por otra parte, el material sustituto óseo respalda de manera duradera el equilibrio de concentración de calcio natural hasta que se completa el proceso de regeneración. Cuando se cumplen aquellas condiciones, no hay ningún aumento de la actividad osteoclástica, por tanto, no hay ningún riesgo de reacciones inflamatorias adversas.

10 La invención del documento EP-B1-2445543 se refiere a un material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico que comprende un núcleo de CAP sinterizado y al menos una capa de crecimiento epitáctico uniforme y cerrada de HAP nanocrystalina depositada sobre la parte superior del núcleo de CAP sinterizado, por lo que los nanocristales de crecimiento epitáctico tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, es decir, una longitud de 30 a 46 nm y un ancho de 14 a 22 nm.

15 El núcleo de CAP sinterizado puede comprender fosfato de tricalcio (TCP), de manera destacable, α -TCP (α -Ca₃(PO₄)₂) o β -TCP (β -Ca₃(PO₄)₂), y/o fosfato de tetracalcio (TTCP) Ca₄(PO₄)₂O.

20 De acuerdo con una realización de uso frecuente, el núcleo de CAP sinterizado consiste esencialmente en TCP, prefiriéndose el α -TCP.

La capa de crecimiento epitáctico de HAP nanocrystalina es casi idéntica estructural y químicamente al mineral óseo humano natural.

25 La capa de crecimiento epitáctico de HAP nanocrystalina tiene, generalmente, un espesor de al menos 15 a 50 nm, preferentemente de al menos 20 a 40 nm, más preferentemente de al menos 25 a 35 nm. Ese espesor mínimo corresponde a una capa de nanocristales de HAP en orientación epitaxial.

30 La capa de crecimiento epitáctico de HAP nanocrystalina puede comprender una o múltiples capas de nanocristales de HAP en orientación epitaxial. El espesor de la capa de crecimiento epitáctico de HAP nanocrystalina, que se relaciona con el número de tales capas de nanocristales de HAP en orientación epitaxial, se seleccionará de acuerdo con la aplicación prevista del material sustituto óseo como implante o prótesis en partes del cuerpo con carga diferente. El material sustituto óseo de esa invención está diseñado, de hecho, para funcionar *in vivo* como sistema de tipo vivo que transforma progresivamente el núcleo de CAP sinterizado en hidroxiapatita similar en tamaño y morfología al mineral óseo humano, dependiendo la velocidad de esa transformación de la velocidad de liberación de calcio mediante el núcleo de CAP sinterizado, que se controla en gran medida mediante el espesor de la capa de crecimiento epitáctico de HAP nanocrystalina.

35 Las propiedades del material sustituto óseo de CAP/HAP se controlan en gran medida mediante el espesor de la capa de crecimiento epitáctico de HAP cristalina. El término "propiedades" incluye la capacidad del sustituto óseo de CAP/HAP para liberar una concentración constante de iones calcio al entorno local *in vitro* e *in vivo*.

40 El espesor de la capa de crecimiento epitáctico de HAP nanocrystalina se relaciona con la relación del material de núcleo de CAP sinterizado respecto a la HAP, siendo dicha relación, generalmente, entre 5:95 y 95:5, preferentemente de 10:90 a 90:10.

45 El material sustituto óseo de CAP/HAP puede ser un material en forma de partículas o un granulado, teniendo las partículas o los gránulos un tamaño y una forma deseados. Generalmente, las partículas o los gránulos son aproximadamente esféricos y tienen un diámetro de 250 a 5.000 μ m.

50 El material sustituto óseo de CAP/HAP también puede ser un cuerpo conformado, por ejemplo, un tornillo, un clavo, un perno o una estructura que tenga el perfil de una parte del cuerpo óseo, tal como, de manera destacable, una cadera, una clavícula, una costilla, una mandíbula o una parte de cráneo. Tal tornillo, clavo o perno se pueden usar en la cirugía ortopédica reconstructiva para fijar un ligamento a un hueso, por ejemplo, en la rodilla o el codo. Tal estructura que tiene el perfil de una parte del cuerpo óseo se puede usar en la cirugía ortopédica como prótesis para el reemplazo de un hueso o una parte ósea defectuosa o que falte.

55 Se enseña que el material sustituto óseo de CAP/HAP del documento EP-B1-2445543 se obtiene mediante un proceso que comprende las etapas de

- 60 a) preparar un material de núcleo de CAP sinterizado,
 b) sumergir el material de núcleo de CAP sinterizado en una solución acuosa a una temperatura entre 10 °C y 50 °C para comenzar el proceso de transformación de CAP en HAP, por lo que se forma una capa de crecimiento epitáctico uniforme y cerrada de hidroxiapatita nanocrystalina sobre la superficie del material de núcleo de CAP sinterizado, teniendo los nanocristales de crecimiento epitáctico el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano,
 65 c) detener la transformación mediante la separación del material sólido de la solución acuosa en un momento en

que está presente un recubrimiento uniforme y cerrado de al menos una capa nanocristalina de HAP, pero antes de que el proceso de transformación se termine por completo,
d) opcionalmente, esterilizar el material separado procedente de la Etapa c).

5 La preparación del material de núcleo de CAP sinterizado se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica que comprenden, en primer lugar, el mezclado de polvos de hidrógeno fosfato de calcio (CaHPO_4), carbonato de calcio y/o hidróxido de calcio, a continuación, la calcinación y la sinterización de la mezcla dentro de un intervalo de temperatura adecuado, dando, de ese modo, un material de núcleo de CAP sinterizado a granel (véanse, por ejemplo, Mathew, M. y col., 1977, Acta. Cryst. B33: 1325; Dickens, B. y col., 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232; y Durucan, C. y col., 2002, J. Mat. Sci., 37:963).

15 Por tanto, se puede obtener un material de núcleo de TCP sinterizado a granel mediante el mezclado de polvos de hidrógeno fosfato de calcio (CaHPO_4), carbonato de calcio y/o hidróxido de calcio en relación estequiométrica, la calcinación y la sinterización de la mezcla a una temperatura en el intervalo de 1.200-1.450 °C, preferentemente a aproximadamente 1.400 °C.

También se puede obtener un material de núcleo de TTCP sinterizado a granel mediante el proceso descrito anteriormente.

20 El material de CAP sinterizado a granel preparado mediante tales métodos puede ser poroso con una porosidad del 2 al 80 % en volumen y una distribución amplia de poros. Los parámetros de porosidad se seleccionarán de acuerdo con la aplicación prevista del material sustituto óseo de CAP/HAP.

25 El material de núcleo de CAP sinterizado usado en la Etapa b) puede ser

- el material de núcleo de CAP sinterizado a granel preparado tal como se ha descrito anteriormente,
- un material en forma de partículas o granulado de material de núcleo de CAP sinterizado obtenido a partir del material de núcleo de CAP sinterizado a granel preparado tal como se ha descrito anteriormente, mediante el uso de métodos convencionales, tales como el machacado, la trituración y/o la molienda y el tamizado, o
- 30 - una preforma de material de núcleo de CAP sinterizado que tenga una forma y un tamaño deseados, por ejemplo, un tornillo, un clavo, un perno o una estructura que tenga el perfil de una parte del cuerpo óseo.

35 Tal preforma de cualquier forma y tamaño deseados se puede obtener a partir del material de núcleo sinterizado a granel preparado tal como se ha descrito anteriormente, mediante el uso de técnicas de creación de prototipos bien conocidas, tales como la molienda de CNC o la impresión en 3D (véanse, por ejemplo, Bartolo, P. y col., 2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-47682-7; Landers, R. y col., 2002, Biomaterials 23(23), 4437; Yeong, W.-Y. y col., 2004, Trends in Biotechnology, 22 (12), 643; y Seitz, H. y col., 2005, Biomed. Mater. Res. 74B (2), 782).

40 Se enseña que la solución acuosa de la Etapa b) es agua pura, un fluido corporal simulado o un tampón. Resulta importante que el valor de pH de la solución de inmersión de la Etapa b) sea casi neutro y permanezca estable durante todo el proceso de transformación, preferentemente dentro de un intervalo de pH de 5,5 a 9,0.

45 La expresión "fluido corporal simulado" se refiere a cualquier solución que imite un fluido corporal. Preferentemente, el fluido corporal simulado tiene una concentración de iones similar a la del plasma en sangre.

El tampón puede ser cualquier tampón en el intervalo de pH anterior, pero es preferentemente un tampón de fosfato con o sin calcio, magnesio y/o sodio.

50 El tampón usado en los Ejemplos (véanse los Ejemplos 4 y 5) es un tampón de fosfato acuoso.

El intervalo de temperatura en la Etapa b) es, generalmente, entre 10 °C y 50 °C, preferentemente entre 25 y 45 °C, más preferentemente entre 35 °C y 40 °C.

55 La Etapa b) de inmersión induce, en una primera fase, una transición de fase de primer orden del material de núcleo de CAP y, por lo tanto, la nucleación de los precursores de nanocristales de HAP. Durante la segunda fase, los precursores de HAP resultantes de la primera fase crecerán y establecerán una capa de material compuesto nanocristalina epitáctica cerrada (es decir, de recubrimiento completo). La primera capa de nanocristales de HAP debe ser uniforme y cerrada y estar conectada epitaxialmente al material de núcleo de CAP sinterizado.

60 Durante una tercera fase, la transición de fase de primer orden puede avanzar dentro del material compuesto bicapa recién formado para transformar adicionalmente el material de núcleo de CAP sinterizado (TCP o TTCP) en HAP nanocristalina. Durante esta tercera etapa de transición de fase, los iones calcio se liberarán durante un tiempo controlable mediante un proceso controlado de difusión lenta hasta que una parte del material de núcleo de CAP sinterizado se haya transformado en HAP nanocristalina. El espesor de la capa de HAP y, por lo tanto, la velocidad de liberación de calcio se pueden controlar mediante la variación del tiempo de transformación.

Se preparará la capa de HAP nanocristalina de crecimiento epitáctico de espesor adecuado *in vitro*, deteniéndose la transformación de CAP en HAP antes de que esta se complete.

5 Tan pronto como se ajuste el material sustituto óseo de CAP/HAP *in vivo*, el proceso de transformación de CAP en HAP se reactivará mediante el contacto con los fluidos corporales y el material sustituto óseo funcionará como un sistema de tipo vivo que formará una nueva hidroxiapatita similar en tamaño y morfología al mineral óseo humano. Durante el proceso de transformación de fase *in vivo*, los iones calcio transportados se liberarán en el entorno local, lo que respaldará el equilibrio de calcio local, que es importante y beneficioso para los procesos de regeneración ósea.

10 Debido a los diferentes tiempos de regeneración de los defectos óseos en las regiones del cuerpo con carga diferente, resulta importante que se pueda controlar la velocidad de liberación de calcio. Esto se puede lograr mediante la variación del espesor de la capa de crecimiento epitáctico de hidroxiapatita.

15 La Etapa c) es, por lo tanto, una etapa muy crítica. El tiempo de exposición en la solución acuosa de la Etapa b) se basa en el espesor de la capa de HAP deseada. Al menos una capa de HAP nanocristalina en orientación epitaxial resulta necesaria. Resulta esencial que la transformación de CAP en HAP no se termine.

20 El tiempo de exposición adecuado de acuerdo con el espesor deseado se puede calcular mediante el uso de varias ecuaciones de diferencial termodinámico bien conocidas por parte de la persona experta en la materia de fosfatos de calcio, química del cemento y el hormigón.

25 Véanse, por ejemplo: Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) Cem. Conc. Res.; 9:765; Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) Cem. Conc. Res.; 12:765; y Schlüssler, K.H. Mcedlov-Petrosjan, O.P.; (1990): Der Baustoff Beton, VEB Verlag Bauwesen, Berlín.

30 La transferencia de la solución de las ecuaciones de diferencial mencionadas anteriormente al sistema de CAP/HAP permite la predicción de la transición de fase de CAP a HAP y el espesor de la capa de tal manera que la capa epitáctica de HAP se pueda preparar de manera estable y reproducible.

La separación del material sólido de la solución acuosa al final de la Etapa c) normalmente se realiza mediante filtración, lavado y secado, usando técnicas muy conocidas en la técnica.

35 En los Ejemplos del documento EP-B1-2445543 (en concreto, el Ejemplo 4 [0057] y el Ejemplo 5 [0058]), el lavado se realiza mediante el lavado de los gránulos separados 3 veces con agua purificada para retirar los residuos de la solución tamponada.

40 La Etapa d) de esterilización opcional se puede realizar mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como irradiación gamma o radiación de rayos X.

45 Mediante el uso, tal como se enseña en los Ejemplos 4 y 5 del documento EP-B1-2445543, de un tampón de fosfato acuoso para la solución acuosa de la Etapa b) y agua purificada para lavar 3 veces los gránulos separados al final de la Etapa c), se obtiene un material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico que comprende un núcleo de CAP sinterizado y una capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocristalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado, por lo que los nanocristales de crecimiento epitáctico tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, es decir, una longitud de 30 a 46 nm y un ancho de 14 a 22 nm, en donde la capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocristalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado tiene una superficie externa no homogénea que comprende agrupamientos individuales (separados) de plaquetas de cristal planas que consisten en nanocristales de HAP de crecimiento epitáctico y áreas lisas entre los agrupamientos individuales de plaquetas de cristal planas, dependiendo el % de la superficie externa ocupada por las áreas lisas entre los agrupamientos individuales de plaquetas de cristal planas del tiempo de transformación en las condiciones de transformación dadas.

55 Véase la Fig. 1A, que representa una imagen de SEM (microscopía electrónica de barrido) del prototipo 1 (gránulo de 1-2 mm) que tiene un tiempo de transformación de 30 min, en donde las áreas lisas representan aproximadamente el 70 % de la superficie externa total, tal como se mide mediante SEM, y la Fig. 1B, que representa una imagen de SEM del prototipo 2 (gránulo de 1-2 mm) que tiene un tiempo de transformación de 40 min, en donde las áreas lisas representan aproximadamente el 50 % de la superficie externa total, tal como se mide mediante SEM.

60 El documento WO 2015/009154 desvela un método para la producción de un material osteoconductor con capacidad osteoinductora mejorada, que comprende someter un material de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico sinterizado que tiene una topografía de superficie que consiste en granos a un tratamiento hidrotérmico a una presión de 200-400 kPa (2-4 bares) a una temperatura igual o superior a 125 °C sin controlar el pH durante un tiempo suficiente para cambiar los granos de fosfato de calcio sobre la superficie del material de partida en agujas de fosfato de calcio de un diámetro de 10-1.500 nm. Una temperatura de al menos 125 °C y una presión de al menos 200 kPa (2 bares) se aleja de las condiciones (se acerca a las fisiológicas del cuerpo humano) usadas en el documento EP-B1-2445543

(temperatura de 35-40 °C, pH de 5,5-9,0, presión ambiente), que permiten el crecimiento epitáctico de los nanocristales de HAP. Esas agujas no crecen epitácticamente, sino que se adhieren a o depositan sobre la base del material de núcleo y únicamente recubren parcialmente (normalmente el 40-90 %) esta última, aumentando, de ese modo, su superficie específica y capacidad de albergar proteínas, lo que potencia, por tanto, su potencial osteoinductor.

Actualmente, se ha hallado que mediante la adición del 10 al 90 %, preferentemente del 20 al 60 %, de un alcohol alifático de cadena corta, incluyendo, pero sin limitación, metanol, etanol, propanol o butanol, al tampón de fosfato acuoso de la Etapa b) en la preparación del material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con el documento EP-B1-2445543, la superficie externa no homogénea de la capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocristalina depositada sobre la superficie externa del material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de núcleo de CAP sinterizado, que comprende agrupamientos individuales de plaquetas de cristal planas y áreas lisas en el medio, se reemplaza con una superficie externa gruesa homogénea que comprende plaquetas de cristal planas sin ningún agrupamiento de cristal individual de plaquetas de cristal planas. Esa superficie externa gruesa homogénea comprende, generalmente, plaquetas de hidroxiapatita nanocristalina de crecimiento epitáctico que forman una red entrelazada de plaquetas con tamaños de plaqueta individual de 0,2 a 20 µm, preferentemente de 0,5 a 5 µm, tal como se determina mediante SEM, dependiendo de la cantidad de alcohol alifático usado.

Tal como se muestra mediante los ensayos *in vitro* de diferenciación osteogénica de células madre mesenquimatosas humanas (hMSC en inglés) fetales, es probable que la respuesta osteogénica *in vivo* sea más fuerte para el material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico que tiene esa superficie externa gruesa homogénea que comprende plaquetas de cristal planas que para el material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico enseñado mediante el documento EP-B1-2445543 que tiene una superficie externa no homogénea que comprende agrupamientos individuales de plaquetas de cristal planas y áreas lisas en el medio.

Sumario de la invención

La invención se refiere, por tanto, a un material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico que comprende un núcleo de CAP sinterizado y una capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocristalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado, por lo que los nanocristales de crecimiento epitáctico tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, en donde la capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocristalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado tiene una superficie externa gruesa homogénea que comprende plaquetas de cristal planas.

Ese material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico muestra una diferenciación osteogénica aumentada de las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) fetales, lo que es una fuerte indicación de una respuesta osteogénica *in vivo* potenciada.

La expresión "capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocristalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado" significa que la capa de crecimiento epitáctico de HAP nanocristalina cubre completamente toda la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado.

La expresión "superficie externa gruesa homogénea que comprende plaquetas de cristal planas" significa que, macroscópicamente, el grano grueso de la superficie externa causado por las plaquetas de cristal planas se distribuye estadísticamente de manera uniforme sobre la superficie del núcleo de CAP sin agrupamientos de cristales individuales de plaquetas de cristal planas. Véase la Fig. 2, que representa imágenes de SEM de los prototipos 3 a 7 del material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de la invención con una superficie externa gruesa homogénea con un grado variable de grano grueso.

La expresión "plaquetas de cristal planas" significa conjuntos de cristal donde la altura (espesor) es considerablemente menor que el ancho y la longitud con respecto a las tres direcciones perpendiculares. Tales plaquetas de cristal planas son claramente visibles en la Fig. 3B.

Generalmente, la superficie externa gruesa homogénea comprende plaquetas de hidroxiapatita nanocristalina de crecimiento epitáctico que forman una red entrelazada de plaquetas con tamaños (ancho y longitud) de 0,2 a 20 µm, tal como se determina mediante SEM. Cuanto más grandes son los tamaños de las plaquetas, mayor es el grano grueso de la superficie externa.

Preferentemente, la superficie externa gruesa homogénea comprende plaquetas de hidroxiapatita nanocristalina de crecimiento epitáctico que forman una red entrelazada de plaquetas con tamaños de 0,5 a 5 µm, tal como se determina mediante SEM.

Normalmente, esa superficie externa gruesa homogénea comprende plaquetas de hidroxiapatita de crecimiento epitáctico que forman una red entrelazada que contiene poros entre 0,03 y 2 µm, tal como se determina mediante porosimetría por intrusión de mercurio (MIP en inglés). Cuanto mayor es el volumen de poro entre 0,03 y 2 µm, mayor

es el grano grueso de la superficie externa.

5 Generalmente, esa superficie externa gruesa homogénea se puede caracterizar mediante AFM (microscopía de fuerza atómica) con una rugosidad de la raíz cuadrada media derivada de AFM (R_q) en un intervalo de 50 a 400 nm y una altura máxima promedio del perfil (R_z) en un intervalo de 500 a 2.000 nm.

10 Preferentemente, la superficie externa gruesa homogénea se puede caracterizar por una rugosidad de la raíz cuadrada media derivada de AFM (R_q) en un intervalo de 110 a 150 nm y una altura máxima promedio del perfil (R_z) en un intervalo de 550 a 750 nm.

15 Generalmente, el porcentaje de HAP en el material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico es del 1 al 90 %, tal como se mide mediante XRD.

15 Preferentemente, ese porcentaje es del 1,5 al 30 %, más preferentemente del 2 al 15 %, tal como se mide mediante XRD.

20 El núcleo de CAP sinterizado comprende fosfato de tricalcio (TCP), de manera destacable, α -TCP (α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) o β -TCP (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), y/o fosfato de tetracalcio (TTCP) $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$.

20 De acuerdo con una realización de uso frecuente, el núcleo de CAP sinterizado consiste esencialmente en TCP, prefiriéndose el α -TCP.

25 La capa de crecimiento epitáctico de HAP nanocristalina es casi idéntica estructuralmente al mineral óseo humano natural.

25 El material sustituto óseo de CAP/HAP puede ser un material en forma de partículas o un granulado, teniendo las partículas o los gránulos un tamaño y una forma deseados. Generalmente, las partículas o los gránulos tienen un tamaño de 250 a 5.000 μm , preferentemente de 1.000 a 2.000 μm .

30 El material sustituto óseo de CAP/HAP también puede ser un cuerpo conformado, por ejemplo, un tornillo, un clavo, un perno o una estructura que tenga el perfil de una parte del cuerpo óseo, tal como, de manera destacable, una cadera, una clavícula, una costilla, una mandíbula o una parte de cráneo. Tal tornillo, clavo o perno se pueden usar en la cirugía ortopédica reconstructiva para fijar un ligamento a un hueso, por ejemplo, en la rodilla o el codo. Tal estructura que tiene el perfil de una parte del cuerpo óseo se puede usar en la cirugía ortopédica como prótesis para el reemplazo de un hueso o una parte ósea defectuosa o que falte.

40 La invención también se refiere a una masilla que comprende partículas o gránulos del sustituto óseo de CAP/HAP definido anteriormente en una matriz adecuada, que comprende, generalmente, polímeros naturales o sintéticos. Generalmente, las partículas o los gránulos tienen un tamaño de 250 a 5.000 μm , preferentemente de 1.000 a 2.000 μm .

La invención se refiere, además, a un proceso de preparación del material sustituto óseo de CAP/HAP definido anteriormente, que comprende las etapas de

- 45 a) preparar un material de núcleo de CAP sinterizado,
 b) sumergir el material de núcleo de CAP sinterizado en una solución de tampón que contiene del 10 al 90 % de un alcohol alifático de cadena corta a una temperatura entre 10 °C y 50 °C para iniciar el proceso de transformación de CAP en HAP, por lo que se formará una capa de crecimiento epitáctico cerrada de hidroxiapatita nanocristalina sobre la superficie del material de núcleo de CAP sinterizado, por lo que los nanocristales de crecimiento epitáctico
 50 tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, en donde la capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocristalina formada sobre la superficie del material de núcleo de CAP sinterizado tiene una superficie externa homogénea que comprende plaquetas de cristal planas,
 c) detener la transformación mediante la separación del material sólido de la solución acuosa en un momento en que está presente un recubrimiento cerrado de al menos una capa nanocristalina de HAP, pero antes de que el
 55 proceso de transformación se termine por completo, y
 d) opcionalmente, esterilizar el material separado procedente de la Etapa c).

Se puede seleccionar un alcohol alifático de cadena corta adecuado del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol y butanol.

60 Preferentemente, el alcohol alifático de cadena corta es etanol.

Preferentemente, la solución de tampón de la Etapa b) contiene del 20 al 60 %, más preferentemente del 30 al 50 %, de un alcohol alifático de cadena corta.

65 Los parámetros de grano grueso de la superficie externa gruesa homogénea de la capa de crecimiento epitáctico

cerrada de HAP nanocristalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado, de manera destacable

- 5
- los parámetros de AFM: la rugosidad de la raíz cuadrada media derivada de AFM (R_q) y la altura máxima promedio del perfil (R_z),
 - los tamaños de las plaquetas de hidroxiapatita nanocristalina de crecimiento epitáctico, tal como se determina mediante SEM y
 - el volumen de poros entre 0,03 y 2 μm , tal como se determina mediante MIP

10 se pueden ajustar convenientemente mediante el cambio del porcentaje del alcohol alifático de cadena corta en la solución de tampón de la solución de transformación.

15 Cuanto mayor es ese porcentaje, menores son la rugosidad de la raíz cuadrada media derivada de AFM (R_q) y la altura máxima promedio del perfil (R_z), más pequeños son los tamaños de las plaquetas de hidroxiapatita nanocristalina de crecimiento epitáctico, tal como se determina mediante SEM, y más pequeño es el volumen de poros entre 0,03 y 2 μm , tal como se determina mediante MIP.

20 La solución de tampón de la Etapa b) que contiene del 10 al 90 % de un alcohol alifático de cadena corta se obtiene mediante el mezclado de una solución de tampón acuosa con cantidades variables de un alcohol alifático de cadena corta. La solución de tampón acuosa se elige de tal manera que el valor de pH de la solución de inmersión de la Etapa b) que contiene, además, del 10 al 90 % de un alcohol alifático de cadena corta sea casi neutro y permanezca estable durante todo el proceso de transformación, preferentemente dentro de un intervalo de pH de 5,5 a 9,0, más preferentemente de 7,0 a 8,0.

25 El tampón puede ser cualquier tampón en el intervalo de pH anterior, pero es preferentemente un tampón de fosfato con o sin calcio, magnesio y/o sodio.

30 Una solución de tampón adecuada es, por ejemplo, una solución acuosa 0,05-0,3 M de dihidrógeno fosfato de sodio (NaH_2PO_4) con un valor de pH de 7,3 a 7,6.

El intervalo de temperatura en la Etapa b) es, generalmente, entre 10 °C y 50 °C, preferentemente entre 25 y 45 °C, más preferentemente entre 35 °C y 40 °C.

35 Preferentemente, la Etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de 35 a 40 °C en una solución de tampón de fosfato de pH de 7,0 a 8,0 que contiene del 20 a 60 % de un alcohol alifático de cadena corta.

40 La preparación del material de núcleo de CAP sinterizado se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica que comprenden, en primer lugar, el mezclado de polvos de hidrógeno fosfato de calcio (CaHPO_4), carbonato de calcio y/o hidróxido de calcio, a continuación, la calcinación y la sinterización de la mezcla dentro de un intervalo de temperatura adecuado, dando, de ese modo, un material de núcleo de CAP sinterizado a granel (véanse, por ejemplo, Mathew, M. y col., 1977, Acta. Cryst. B33: 1325; Dickens, B. y col., 1974, J. Solid State Chemistry 10, 232; y Durucan, C. y col., 2002, J. Mat. Sci., 37:963).

45 Por tanto, se puede obtener un material de núcleo de TCP sinterizado a granel mediante el mezclado de polvos de hidrógeno fosfato de calcio (CaHPO_4), carbonato de calcio y/o hidróxido de calcio en relación estequiométrica, la calcinación y la sinterización de la mezcla a una temperatura en el intervalo de 1.200-1.450 °C, preferentemente a aproximadamente 1.400 °C.

50 También se puede obtener un material de núcleo de TTCP sinterizado a granel mediante el proceso descrito anteriormente.

55 El material de CAP sinterizado a granel preparado mediante tales métodos puede ser poroso con una porosidad del 2 al 80 % en volumen y una distribución amplia de poros. Los parámetros de porosidad se seleccionarán de acuerdo con la aplicación prevista del material sustituto óseo de CAP/HAP.

El material de núcleo de CAP sinterizado usado en la Etapa b) puede ser

- 60
- el material de núcleo de CAP sinterizado a granel preparado tal como se ha descrito anteriormente,
 - un material en forma de partículas o granulado de material de núcleo de CAP sinterizado obtenido a partir del material de núcleo de CAP sinterizado a granel preparado tal como se ha descrito anteriormente, mediante el uso de métodos convencionales, tales como el machacado, la trituración y/o la molienda y el tamizado, o
 - una preforma de material de núcleo de CAP sinterizado que tenga una forma y un tamaño deseados, por ejemplo, un tornillo, un clavo, un perno o una estructura que tenga el perfil de una parte del cuerpo óseo.

65 Tal preforma de cualquier forma y tamaño deseados se puede obtener a partir del material de núcleo sinterizado a granel preparado tal como se ha descrito anteriormente, mediante el uso de técnicas de creación de prototipos bien

conocidas, tales como la molienda de CNC o la impresión en 3D (véanse, por ejemplo, Bartolo, P. y col., 2008, Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine, Springer Science New York, ISBN 978-0-387-47682-7; Landers, R. y col., 2002, Biomaterials 23(23), 4437; Yeong, W.-Y. y col., 2004, Trends in Biotechnology, 22 (12), 643; y Seitz, H. y col., 2005, Biomed. Mater. Res. 74B (2), 782).

La Etapa b) de inmersión induce, en una primera fase, una transición de fase de primer orden del material de núcleo de CAP y, por lo tanto, la nucleación de los precursores de nanocristales de HAP. Durante la segunda fase, los precursores de HAP resultantes de la primera fase crecerán y establecerán una capa de material compuesto nanocristalina epitáctica cerrada (es decir, de recubrimiento completo). La primera capa de nanocristal de HAP debe ser uniforme y cerrada y estar conectada epitácticamente al material de núcleo de CAP sinterizado.

Durante una tercera fase, la transición de fase de primer orden puede avanzar dentro del material compuesto bicapa recién formado para transformar adicionalmente el material de núcleo de CAP sinterizado (TCP o TTCP) en HAP nanocristalina. Durante esta tercera etapa de transición de fase, los iones calcio se liberarán durante un tiempo controlable mediante un proceso controlado de difusión lenta hasta que una parte del material de núcleo de CAP sinterizado se haya transformado en HAP nanocristalina. El espesor de la capa de HAP y, por lo tanto, la velocidad de liberación de calcio se pueden controlar mediante la variación del tiempo de transformación.

Se preparará la capa de HAP nanocristalina de crecimiento epitáctico de espesor adecuado *in vitro*, deteniéndose la transformación de CAP en HAP antes de que esta se complete.

Tan pronto como se ajuste el material sustituto óseo de CAP/HAP *in vivo*, el proceso de transformación de CAP en HAP se reactivará mediante el contacto con los fluidos corporales y el material sustituto óseo funcionará como un sistema de tipo vivo que formará una nueva hidroxiapatita similar en tamaño y morfología al mineral óseo humano. Durante el proceso de transformación de fase *in vivo*, los iones calcio transportados se liberarán en el entorno local, lo que respaldará el equilibrio de calcio local, que es importante y beneficioso para los procesos de regeneración ósea.

Debido a los diferentes tiempos de regeneración de los defectos óseos en las regiones del cuerpo con carga diferente, resulta importante que se pueda controlar la velocidad de liberación de calcio. Esto se puede lograr mediante la variación del espesor de la capa de crecimiento epitáctico de hidroxiapatita.

La Etapa c) es, por lo tanto, una etapa muy crítica. El tiempo de exposición en la solución acuosa de la Etapa b) se basa en el espesor de la capa de HAP deseada. Al menos una capa de HAP nanocristalina en orientación epitaxial resulta necesaria. Resulta esencial que la transformación de CAP en HAP no se termine.

El tiempo de exposición adecuado, de acuerdo con el espesor deseado, se puede calcular mediante el uso de varias ecuaciones de diferencial termodinámico bien conocidas por parte de la persona experta en la materia de fosfatos de calcio y química del cemento y el hormigón.

Véanse, por ejemplo: Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1979) Cem. Conc. Res.; 9:765; Pommersheim, J.C.; Clifton, J.R. (1982) Cem. Conc. Res.; 12:765; y Schlussler, K.H. Mcedlov-Petrosjan, O.P.; (1990): Der Baustoff Beton, VEB Verlag Bauwesen, Berlín.

La transferencia de la solución de las ecuaciones de diferencial mencionadas anteriormente al sistema de CAP/HAP permite la predicción de la transición de fase de CAP a HAP y el espesor de la capa de tal manera que la capa epitáctica de HAP se pueda preparar de manera estable y reproducible.

La separación del material sólido de la solución acuosa normalmente se realiza mediante filtración y secado, usando técnicas muy conocidas en la técnica.

La Etapa d) de esterilización opcional se puede realizar mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como irradiación gamma o radiación de rayos X.

La invención también se refiere al uso del material sustituto óseo de CAP/HAP definido anteriormente, generalmente en forma de un material en forma de partículas, una masilla o un cuerpo conformado como implante o prótesis, para respaldar la formación ósea, la regeneración ósea, la corrección ósea y/o el reemplazo óseo en un sitio defectuoso en un ser humano o animal.

La invención también se refiere a un método para favorecer la formación ósea, la regeneración ósea y/o la corrección ósea en un sitio defectuoso en un ser humano o animal mediante el implante del material sustituto óseo de CAP/HAP definido anteriormente, generalmente en forma de un material en forma de partículas, una masilla o un cuerpo conformado.

Ventajas del material sustituto óseo de CAP/HAP de la invención y el proceso de preparación del mismo.

Ese material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de la invención con una superficie

externa gruesa homogénea que comprende plaquetas de cristal planas muestra una diferenciación osteogénica aumentada de las células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) fetales, en particular, una expresión superior de los marcadores de diferenciación osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN), en comparación con el material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico enseñado mediante el documento EP-B1-2445543 que tiene una superficie externa no homogénea que comprende agrupamientos individuales de plaquetas de cristal planas y áreas lisas en el medio. Esto es una fuerte indicación de una respuesta osteogénica *in vivo* potenciada.

Esto está en línea con los resultados publicados por R.A. Gittens y col. en *Biomaterials*, mayo de 2011, 32(13): 3395-3403, que muestran que la introducción de estructuras a escala nanométrica en combinación con la rugosidad a escala micro-submicrométrica mejora la diferenciación osteoblástica y la producción de factores locales, lo que a su vez indica la posible oseointegración *in vivo* de implante mejorada.

El proceso de preparación del material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de la invención permite ajustar convenientemente los parámetros de grano grueso de la superficie externa gruesa homogénea de la capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocristalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado, de manera destacable

- los parámetros de AFM: la rugosidad de la raíz cuadrada media derivada de AFM (R_q) y la altura máxima promedio del perfil (R_z),
- los tamaños de las plaquetas de hidroxiapatita nanocristalina de crecimiento epitáctico, tal como se determina mediante SEM y
- el volumen de poros entre 0,03 y 2 μm , tal como se determina mediante MIP,

mediante el ajuste del porcentaje del alcohol alifático de cadena corta en la solución de tampón de la solución de transformación.

Cuanto mayor es ese porcentaje, menores son la rugosidad de la raíz cuadrada media derivada de AFM (R_q) y la altura máxima promedio del perfil (R_z), más pequeños son los tamaños de las plaquetas de hidroxiapatita nanocristalina de crecimiento epitáctico, tal como se determina mediante SEM, y más pequeño es el volumen de poros entre 0,03 y 2 μm , tal como se determina mediante MIP.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá con más detalle en lo sucesivo en el presente documento con referencia a los Ejemplos ilustrativos de las realizaciones preferidas de la invención y las figuras de los dibujos adjuntos, en las que:

la Fig. 1A representa una imagen de SEM del prototipo 1 (gránulo de 1-2 mm) de un material sustituto óseo desvelado mediante el documento EP-B1-2445543 y preparado en el Ejemplo 1 que tiene un tiempo de transformación de 30 min, en donde las áreas lisas representan aproximadamente el 70 % de la superficie externa total, tal como se mide mediante SEM.

La Fig. 1B representa una imagen de SEM del prototipo 2 (gránulo de 1-2 mm) de un material sustituto óseo desvelado mediante el documento EP-B1-2445543 y preparado en el Ejemplo 1 que tiene un tiempo de transformación de 40 min, en donde las áreas lisas representan aproximadamente el 50 % de la superficie externa total, tal como se mide mediante SEM.

Las Fig. 2A-2E representan imágenes de SEM del prototipo 3 (Fig. 2A: etanol al 20 %, gránulo de 1-2 mm), prototipo 4 (Fig. 2B: etanol al 30 %, gránulo de 1-2 mm), prototipo 5 (Fig. 2C: etanol al 40 %, gránulo de 1-2 mm), prototipo 6 (Fig. 2D: etanol al 50 %, gránulo de 1-2 mm) y prototipo 7 (Fig. 2E: etanol al 60 %, gránulo de 1-2 mm) de materiales sustitutos óseos de acuerdo con la invención.

Todas las imágenes de SEM de la Fig. 1 y las Fig. 2A-2E tienen un aumento de 3.500.

La Fig. 3A representa una imagen de SEM de una sección transversal del prototipo 5 (etanol al 40 %, gránulo de 1-2 mm) a bajo aumento (1.000 x). La esquina inferior derecha muestra la superficie externa del gránulo y el centro del gránulo se localiza hacia la esquina superior izquierda.

La Fig. 3B representa una imagen de SEM de una sección transversal del prototipo 5 (etanol al 40 %, gránulo de 1-2 mm) a mayor aumento (14.000 x).

La Fig. 4 representa imágenes de SEM (las dos imágenes superiores) e imágenes de AFM (las otras cuatro imágenes) de los prototipos 3a (izquierda: etanol al 20 %) y 6a (derecha: etanol al 50 %) de discos no porosos de materiales sustitutos óseos de acuerdo con la invención preparados en el Ejemplo 2.

Las Fig. 5A-5B representan las respuestas de la osteocalcina (OCN, Fig. 5A) y la osteopontina (OPN, Fig. 5B) de células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) fetales en contacto con los materiales sustitutos óseos de acuerdo con la invención en comparación con los materiales sustitutos óseos de la técnica anterior en un ensayo *in vitro*.

La Fig. 6 representa diagramas de MIP de gránulos de 1-2 mm de los prototipos 3 (etanol al 20 %), 5 (etanol al 40 %) y 7 (etanol al 60 %) de los gránulos de 1-2 mm de los materiales sustitutos óseos de acuerdo con la invención preparados en el Ejemplo 2 y el α -TCP puro producido tal como se describe en el Ejemplo 1.

Descripción detallada

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

5 Ejemplo 1: preparación de materiales sustitutos óseos de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásicos de acuerdo con el documento EP-B1-2445543.

10 Se preparó un material sinterizado a granel de alfa-TCP, gránulos porosos del mismo con un tamaño de partícula de 1,0-2,0 mm y gránulos transformados que tenían un recubrimiento de HAP de crecimiento epitáctico de manera similar a los Ejemplos 1, 2 y 4 del documento EP-B1-2445543. Se mezclaron 364 g de polvo anhidro de fosfato de dicalcio, 136 g de polvo de carbonato de calcio y 220 ml de agua desionizada durante 5 min a 700 rpm usando un agitador de laboratorio. La suspensión del proceso de mezclado se transfirió inmediatamente a una copa de platino estable a alta temperatura. La copa de platino llena se colocó en un horno en frío. El horno se calentó hasta 1.400 °C mediante el uso de una velocidad de calentamiento de 100 °C por hora. Esta temperatura se mantuvo durante 12 horas y, posteriormente, el horno se enfrió hasta 800 °C con una velocidad de enfriamiento de 500 °C por hora, a continuación, se enfrió hasta 300 °C con una velocidad de enfriamiento de 125 °C por hora y, finalmente, se enfrió hasta temperatura ambiente mediante el cambio del horno. El material sinterizado a granel (α -Ca₃(PO₄)₂ en fase pura) se retiró del horno y la copa de platino. El control de la pureza de fase se realizó usando un análisis de difracción de polvo de rayos X.

20 El producto a granel se machacó mediante el uso de una machacadora de mordazas (las distancias entre las mordazas variaron de 10 a 1 mm). Los gránulos producidos se tamizaron mediante el uso de una máquina de tamizado e insertos de tamiz con aperturas de malla de 2 mm y 1 mm. Después del tamizado, los gránulos se enjuagaron con etanol para la separación de los residuos de polvo fino adsorbidos en los gránulos. Los gránulos porosos se secaron durante 1 h a 80 °C en un secador de gabinete. La limpieza de las superficies de las partículas después del enjuague se controló mediante la observación de la superficie usando microscopía electrónica de barrido.

25 Se preparó una solución tamponada adecuada para el proceso de recubrimiento y transformación de fase mediante la disolución de 0,4 mol/l de dihidrógeno fosfato de sodio (NaH₂PO₄) en agua destilada. El pH de la solución se ajustó hasta 7,45 a temperatura ambiente mediante el uso de hidróxido de sodio (NaOH). Los gránulos producidos de acuerdo con los párrafos anteriores se sumergieron en la solución preparada y se almacenaron en un baño de agua bien templado (40 °C) durante 30 min (prototipo 1), respectivamente, 40 min (prototipo 2). Después de la inmersión, los gránulos se enjuagaron 3 veces con agua destilada para detener el proceso de transformación de fase y retirar los residuos de la solución tamponada. Los gránulos porosos se secaron a 100 °C en un secador de gabinete durante 2 horas. La SEM con un aumento de 3.500 x se realizó en gránulos del prototipo 1 y prototipo 2.

35 Tal como resulta evidente a partir de las Fig. 1A y 1B, que representan imágenes de SEM de los prototipos 1 y 2, la superficie externa de los gránulos es no homogénea que comprende agrupamientos individuales (separados) de plaquetas de cristal planas que consisten en nanocristales de HAP de crecimiento epitáctico y áreas lisas entre los cristales.

40 Mediante la medición de la superficie ocupada por los agrupamientos individuales y las áreas lisas en las imágenes de SEM de cada uno del prototipo 1 y prototipo 2, se determinó que las áreas lisas representan aproximadamente el 70 % de la superficie externa, en el caso del prototipo 1, y aproximadamente el 50 % de la superficie externa, en el caso del prototipo 2.

45 Ejemplo 2: preparación de materiales sustitutos óseos de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásicos de acuerdo con la invención.

1) Preparación de gránulos de material sustituto óseo

50 Se produjeron gránulos porosos de 1-2 mm de α -TCP en fase pura, tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

La etapa de transformación de fase y recubrimiento se realizó en matraces de vidrio colocados en un baño de agua ajustado hasta 40 °C. El tampón de transformación fue una solución acuosa de dihidrógeno fosfato de sodio (NaH₂PO₄) mezclado con diferentes proporciones de etanol. La molaridad de la solución acuosa de dihidrógeno fosfato de sodio varió entre 0,05 M y 0,3 M y el contenido de etanol entre el 20 y el 60 % en p/p. El pH de la solución de transformación estaba entre 7,3 y 7,6.

60 Los matraces de vidrio se llenaron con el tampón de transformación y se añadieron gránulos de alfa-TCP con una relación entre 1:40 y 1:80 (gránulos respecto a solución de transformación). Los gránulos se sumergieron en la solución de transformación a 40 °C durante un período entre 24 y 72 horas. Después de la inmersión, los gránulos se enjuagaron 5 veces con agua desionizada (siendo la relación de gránulos respecto a agua de 1:10 con respecto al peso) y 2 veces con etanol (al 99,9 %, siendo la relación de gránulos respecto a etanol de 1:10 con respecto al peso) para detener el proceso de transformación de fase y retirar los residuos de la solución tamponada. Los gránulos porosos se secaron a 100 °C en un secador de gabinete durante 2 horas.

65 La morfología de la superficie después del proceso de recubrimiento y de transformación de fase se observó usando

SEM.

La Fig. 2 representa imágenes de SEM con un aumento de 3.500 x del prototipo 3 (etanol al 20 %), prototipo 4 (etanol al 30 %), prototipo 5 (etanol al 40 %), prototipo 6 (etanol al 50 %) y prototipo 7 (etanol al 60 %) de materiales sustitutos óseos de acuerdo con la invención. Se puede observar, mediante la comparación de las Fig. 1A y 1B con la Fig. 2, que la superficie externa no homogénea de los prototipos 1 y 2 con los agrupamientos individuales de plaquetas de cristal planas y las áreas lisas en medio se reemplaza con una superficie externa gruesa homogénea sin ningún agrupamiento de cristal individual. La superficie externa gruesa homogénea está constituida por una red entrelazada de plaquetas de hidroxiapatita de crecimiento epitáctico. Los tamaños de las plaquetas individuales se disminuyen mediante el aumento del contenido de etanol en la solución de transformación, tal como se observa mediante el análisis de SEM, disminuyendo, por tanto, el grano grueso o la rugosidad de la superficie externa.

La Fig. 3A representa una imagen de SEM de una sección transversal del prototipo 5 (etanol al 40 %, gránulo de 1-2 mm) a bajo aumento (1.000 x). La esquina inferior derecha muestra la superficie externa del gránulo y el centro del gránulo se localiza hacia la esquina superior izquierda.

La Fig. 3B representa una imagen de SEM de una sección transversal del prototipo 5 (etanol al 40 %, gránulo de 1-2 mm) a mayor aumento (14.000 x), donde se pueden observar claramente las plaquetas de cristal planas individuales, que son los bloques de construcción de la superficie gruesa. No existe ninguna diferencia entre la superficie externa gruesa en el centro del gránulo y la superficie externa gruesa en la superficie externa del gránulo.

Determinación de la distribución de tamaño de poro mediante porosimetría por intrusión de mercurio (MIP)

La distribución de tamaño de poro de los gránulos se determinó usando porosimetría por intrusión de mercurio (MIP). La MIP es una técnica de caracterización convencional usada para determinar la distribución de tamaño de poro de los materiales porosos. La técnica es bien conocida en la técnica y, por ejemplo, se describe en Gregg, S. J. y Sing, K.S.W., Adsorption, Surface Area and Porosity, 2ª ed., Academic Press Inc. (1982), 173-190.

La Fig. 6 representa diagramas de MIP de los prototipos 3, 5 y 7 de los materiales sustitutos óseos de acuerdo con la invención en comparación con el α -TCP puro (producido de acuerdo con el Ejemplo 1 y el material de núcleo de los prototipos 3, 5 y 7). Todas las mediciones se realizaron con gránulos de 1-2 mm.

Se puede observar que la muestra de α -TCP puro no tiene ningún poro en el intervalo de 0,03 a 2 μm debido a su superficie lisa. Todos los materiales sustitutos óseos de acuerdo con la invención contienen poros en el intervalo de 0,03 a 2 μm debido a la naturaleza porosa de la superficie externa gruesa homogénea, que está constituida por una red entrelazada de plaquetas de hidroxiapatita de crecimiento epitáctico. El volumen de poro de la superficie externa gruesa, que corresponde al área bajo la curva de MIP en el intervalo de 0,03 a 2 μm , depende de los tamaños de plaquetas individuales de la red entrelazada. Cuanto más grandes son las plaquetas individuales, mayor es el volumen de poro incluido de la red entrelazada. Por tanto, el volumen de poro incluido de la red entrelazada se puede correlacionar directamente con el grano grueso de la superficie. Cuanto mayor es el volumen de poro en el intervalo de 0,03 a 2 μm en el diagrama de MIP, mayor es el grano grueso de la superficie. El prototipo 3 tiene el mayor volumen de poro (área bajo la curva) en el intervalo de 0,03 a 2 μm de los prototipos mostrados, seguido del prototipo 5 y 7. Se confirma, mediante el análisis de SEM en las Fig. 2A-2E, que el grano grueso de los prototipos disminuye del prototipo 3 al prototipo 5 y 7.

2) Preparación de discos no porosos de material sustituto óseo

Los gránulos de 1-2 mm de tamaño de α -TCP en fase pura producidos tal como se describe en el Ejemplo 1 anterior se molieron con un molino planetario durante 20 horas a 150 rpm para obtener un polvo fino. El polvo fino se llenó en un molde de prensado y se compactó con una prensa manual con una carga de 1 tonelada. El cuerpo de color verde se retiró del molde y se transfirió a un horno de alta temperatura. El horno se calentó hasta 1450 °C mediante el uso de una velocidad de calentamiento de 250 °C por hora. Esta temperatura se mantuvo durante 24 horas y, posteriormente, el horno se enfrió hasta 800 °C con una velocidad de enfriamiento de 500 °C por hora y, a continuación, se enfrió hasta temperatura ambiente con una velocidad de enfriamiento de 150 °C por hora. El material no poroso sinterizado a granel α -Ca₃(PO₄)₂ en fase pura se retiró del horno. El control de la pureza de fase se realizó usando un análisis de difracción de polvo de rayos X y las características de la superficie se analizaron mediante el uso de SEM. La transformación de fase y el recubrimiento de los discos preparados se realizó tal como se ha descrito anteriormente en 1), con la única diferencia de que la relación en peso del α -TCP respecto a la solución de transformación fue de 1 a 3,5.

Por tanto, se prepararon los prototipos 3a (etanol al 20 %) y 6a (etanol al 50 %) de los materiales sustitutos óseos de acuerdo con la invención.

La morfología de la superficie después del proceso de recubrimiento y de transformación de fase se observó usando SEM. Los parámetros de rugosidad correspondientes se determinaron usando microscopía de fuerza atómica AFM.

Las imágenes de SEM en la Fig. 4 confirman que la morfología de la superficie externa gruesa homogénea de los discos no porosos es idéntica a la superficie externa gruesa de los gránulos producidos con el contenido de etanol correspondiente del Ejemplo 2, párrafo 1 (prototipos 3 y 3a y prototipos 6 y 6a).

5 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las mediciones de superficie a nanoescala se evaluaron usando la microscopía de fuerza atómica (TT-AFM, taller de AFM) en modo de contacto intermitente. Los análisis de AFM se realizaron en atmósfera ambiente usando discos cilíndricos no porosos con un diámetro de 11 mm y una altura de 1 mm. Se usaron una frecuencia de resonancia de 190 kHz y un radio de punta de hasta 10 nm. Cada análisis de AFM se realizó sobre un área de 50 µm x 50 µm y se exploraron tres muestras de cada grupo. Los datos originales se nivelaron en plano para retirar la inclinación mediante la aplicación de una corrección numérica y los valores medios de la rugosidad de la raíz cuadrada media (R_q) y la altura máxima promedio del perfil (R_z) se determinaron usando el soporte lógico Gwyddion.

15 Una caracterización de superficie similar de la superficie se describe, por ejemplo, en el documento US-2013-0045360-A1.

La Fig. 4 representa imágenes de AFM de los prototipos 3a (etanol al 20 %, lado izquierdo) y 6a (etanol al 50 %, lado derecho) de discos no porosos preparados de acuerdo con la invención. Los valores de la rugosidad derivada de AFM de los prototipos 3a y 6a se pueden hallar en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

Valores de la rugosidad derivada de AFM de los prototipos 3a y 6a.		
	R_q [nm]	R_z [nm]
Prototipo 3a (etanol al 20 %)	237 ± 31	1.391 ± 194
Prototipo 6a (etanol al 50 %)	130 ± 13	630 ± 82

25 Tal como se observa en la Tabla 1, el valor medio de la rugosidad de la raíz cuadrada media (R_q) disminuyó de 237 nm a 130 nm y la altura máxima promedio del perfil (R_z) disminuyó de 1.391 nm a 630 nm mediante el aumento del contenido de etanol del 20 % al 50 %.

Ejemplo 3: ensayo *in vitro* de la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimatosas humanas (hMSC) fetales.

30 A fin de evaluar si los prototipos de material sustituto óseo preparados en los Ejemplos 1 y 2 respaldan la diferenciación osteogénica, aproximadamente 200.000 hMSC aisladas de un fémur fetal humano después de 22 semanas de gestación (disponible en el mercado a través de ScienCell: n.º Cat 7500, n.º de lote 6890) se sembraron en gránulos de 320 mg de aquellos prototipos de material sustituto óseo y se cultivaron durante tres semanas. En los primeros siete días de cultivo, se usó el medio de expansión de hMSC disponible en el mercado (Medio MSCM, n.º Cat 7501, ScienCell) para respaldar óptimamente la proliferación celular. Durante los siguientes 14 días, el medio se cambió a DMEM complementado con FBS al 10 % y penicilina/estreptomina. No se añadieron agentes osteogénicos adicionales al medio de cultivo celular. Después de tres semanas de cultivo de hMSC, se aisló el ARNm total, se transcribió en ADNc y se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real. La expresión génica se calculó después del método de $\Delta\Delta CT$ (véase Livak K.J. y Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method, 2001, Methods 25, páginas 402-408) usando GAPDH como gen constitutivo. La expresión de los marcadores de diferenciación osteogénica osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN) se midió en todos los prototipos de material sustituto óseo en forma granular (1-2 mm) preparados en los Ejemplos 1 y 2. Esas mediciones mostraron una expresión significativamente mayor de los marcadores de diferenciación osteogénica OPN y OCN en los prototipos de material sustituto óseo de acuerdo con la invención del Ejemplo 2 que en los prototipos de material sustituto óseo de la técnica anterior del Ejemplo 1 (véanse las Fig. 5A-5B).

Basándose en estos resultados *in vitro*, cabe esperar una respuesta osteogénica potenciada en los prototipos de material sustituto óseo de acuerdo con la presente invención *in vivo*.

Ejemplo 4: comparación del tamaño y la morfología de los cristales en los nanocristales de HAP del material sustituto óseo de CAP/HAP bifásico de la invención y el mineral óseo humano.

El análisis del tamaño de los cristales se realizó mediante el uso, tal como en el documento EP-B1-2445543, de una afinación de los datos de difracción de rayos X mediante la aplicación del método Bragg en las muestras del prototipo 3 y en mineral óseo humano natural.

Por tanto, se mostró que el material sustituto óseo de CAP/HAP bifásico de la invención y el mineral óseo humano

tienen la misma morfología y el mismo tamaño de los cristales.

Véase la Tabla 2, a continuación.

5

Tabla 2

<u>Comparación del tamaño y la morfología del cristal de HAP en el sustituto óseo de CAP/HAP de la invención y el mineral óseo humano</u>		
Ejes cristalográficos (grupo espacial hexagonal $P6_3/m$)	CAP/HAP de la invención que se prepara a temperatura fisiológica. Tamaño de cristal* [nm]	mineral óseo humano natural Tamaño de cristal* [nm]
a (1,0,0)	18 (± 4)	15-21
b (0,1,0)	18 (± 4)	15-21
c (0,0,1)	38 (± 8)	34-45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico que comprende un núcleo de CAP sinterizado y una capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocrystalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado, por lo que los nanocristales de crecimiento epitáctico tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, en donde la capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocrystalina depositada sobre la superficie externa del núcleo de CAP sinterizado tiene una superficie externa gruesa homogénea que comprende plaquetas de cristal planas.
- 10 2. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la superficie gruesa comprende plaquetas de hidroxiapatita nanocrystalina de crecimiento epitáctico que forman una red entrelazada de plaquetas con tamaños de 0,2 a 20 μm , tal como se determina mediante microscopía electrónica de barrido (SEM en inglés).
- 15 3. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la superficie gruesa comprende plaquetas de hidroxiapatita nanocrystalina de crecimiento epitáctico que forman una red entrelazada de plaquetas con tamaños de 0,5 a 5 μm , tal como se determina mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- 20 4. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la superficie externa gruesa homogénea comprende plaquetas de hidroxiapatita de crecimiento epitáctico que forman una red entrelazada que contiene poros entre 0,03 y 2 μm , tal como se determina mediante porosimetría por intrusión de mercurio (MIP en inglés).
- 25 5. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la superficie externa gruesa homogénea se caracteriza mediante microscopía de fuerza atómica (AFM en inglés) con una rugosidad de la raíz cuadrada media derivada de AFM R_q en un intervalo de 50 a 400 nm y una altura máxima promedio del perfil R_z en un intervalo de 500 a 2.000 nm.
- 30 6. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la superficie externa gruesa homogénea se caracteriza mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) con una rugosidad de la raíz cuadrada media derivada de AFM (R_q) en un intervalo de 110 a 150 nm y una altura máxima promedio del perfil (R_z) en un intervalo de 550 a 750 nm.
- 35 7. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el núcleo de CAP sinterizado consiste esencialmente en α -TCP.
- 40 8. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el porcentaje de HAP es del 1,5 al 30 %, tal como se mide mediante XRD.
- 45 9. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es un material en forma de partículas o un granulado.
- 50 10. Material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es un cuerpo conformado.
- 55 11. Una masilla que contiene gránulos de un material sustituto óseo de fosfato de calcio/hidroxiapatita (CAP/HAP) bifásico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en una matriz adecuada.
- 60 12. Un proceso de preparación del material sustituto óseo de CAP/HAP de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende las etapas de
 - a) preparar un material de núcleo de CAP sinterizado,
 - b) sumergir el material de núcleo de CAP sinterizado en una solución de tampón que contiene del 10 al 90 % de un alcohol alifático de cadena corta a una temperatura entre 10 °C y 50 °C para iniciar el proceso de transformación de CAP en HAP, por lo que se formará una capa de crecimiento epitáctico cerrada de hidroxiapatita nanocrystalina sobre la superficie del material de núcleo de CAP sinterizado, por lo que los nanocristales de crecimiento epitáctico tienen el mismo tamaño y morfología que el mineral óseo humano, en donde la capa de crecimiento epitáctico cerrada de HAP nanocrystalina formada sobre la superficie del material de núcleo de CAP sinterizado tiene una superficie externa gruesa homogénea que comprende plaquetas de cristal planas,
 - c) detener la transformación mediante la separación del material sólido de la solución acuosa en un momento en que está presente un recubrimiento cerrado de al menos una capa nanocrystalina de HAP, pero antes de que el proceso de transformación se termine por completo, y
 - d) opcionalmente, esterilizar el material separado procedente de la Etapa c).
- 65 13. Un proceso de la reivindicación 12, en donde el alcohol alifático de cadena corta es etanol.

14. Un proceso de la reivindicación 12 o 13, en donde la solución de tampón de la Etapa b) contiene del 30 al 50 % de un alcohol alifático de cadena corta.
- 5 15. Un proceso de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la Etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de 35 a 40 °C en una solución de tampón de fosfato de pH de 7,0 a 8,0 que contiene del 20 al 60 % de un alcohol alifático de cadena corta.

Fig 1a

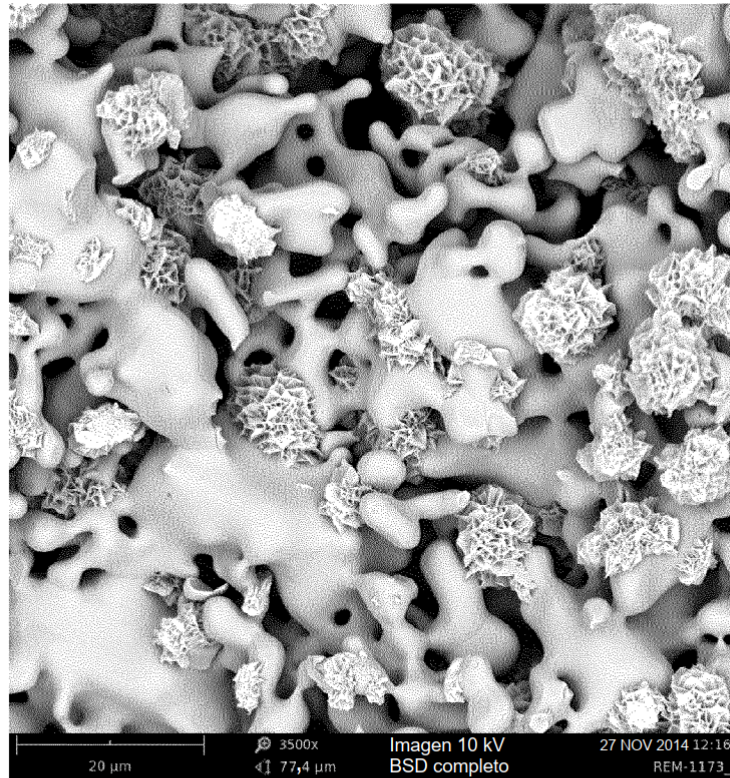


Fig1b

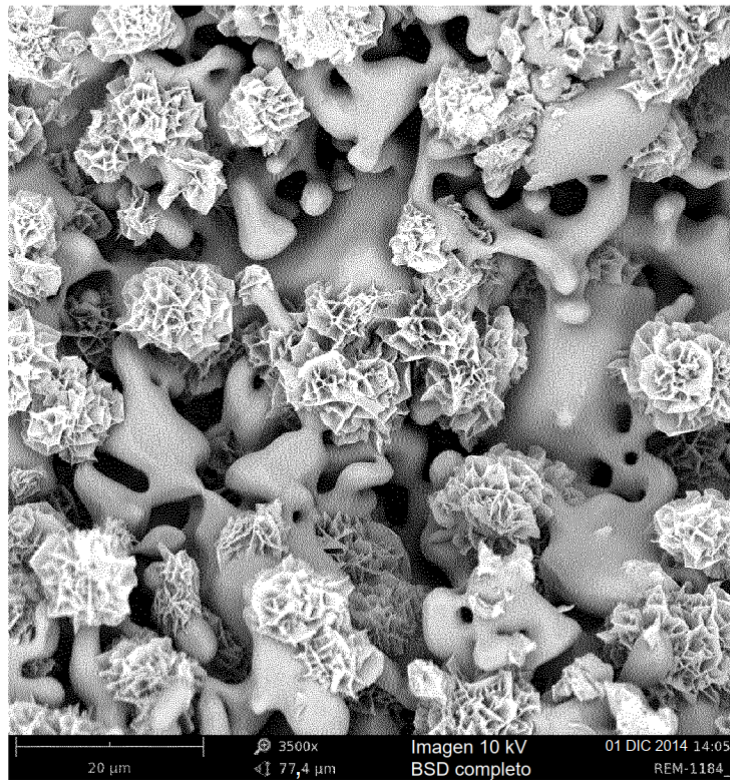


Fig 2

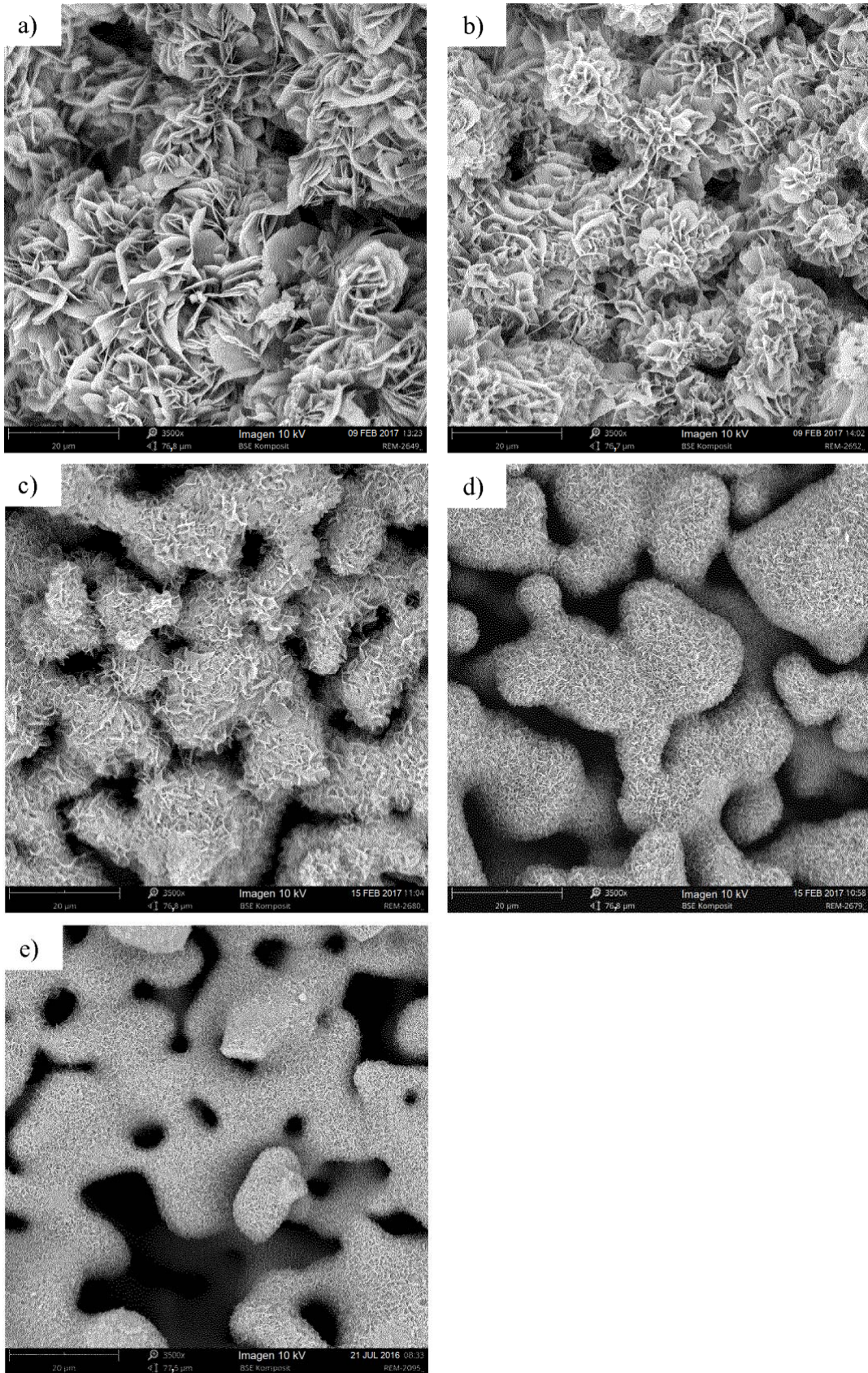


Fig 3a

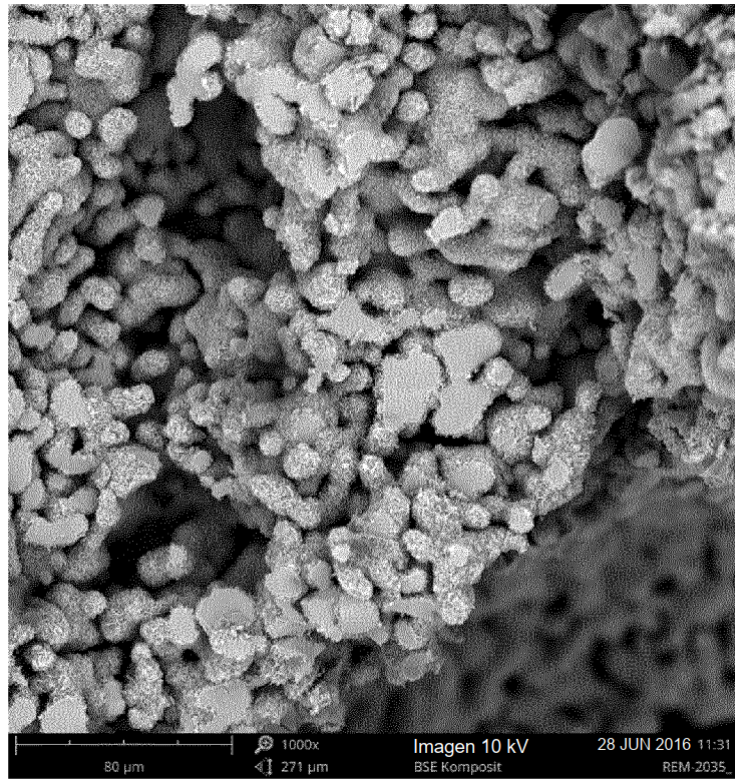


Fig3b

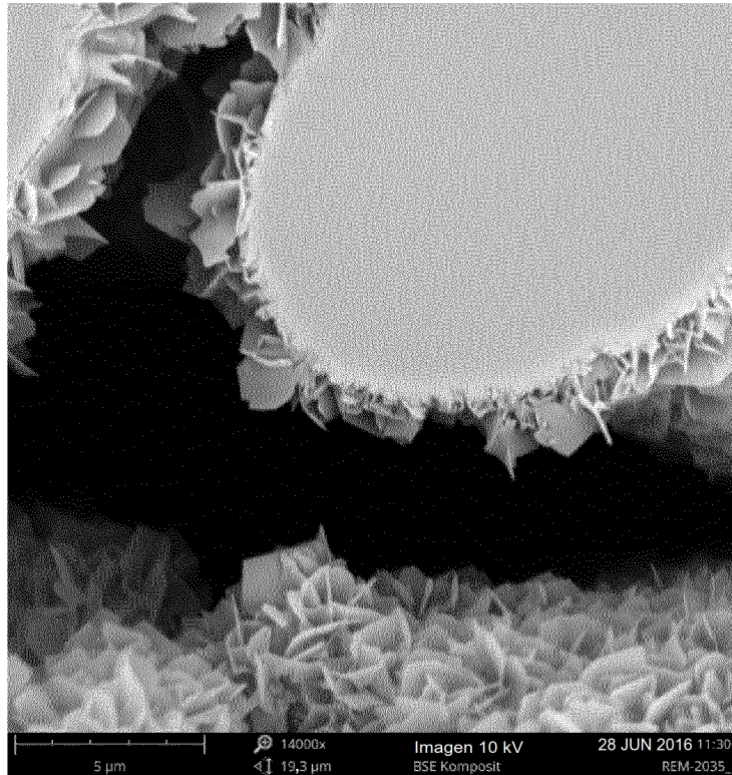


Fig. 4

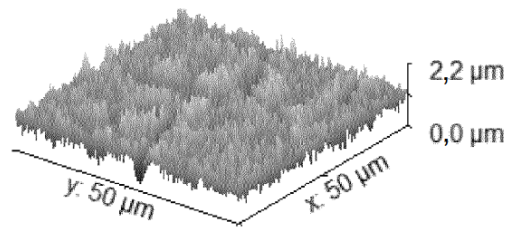
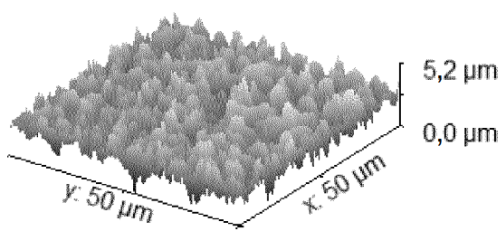
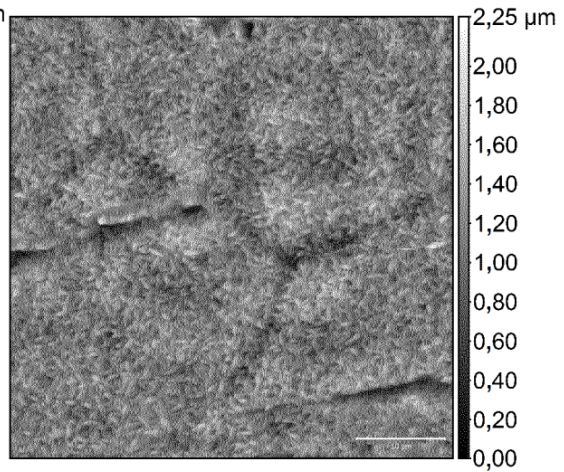
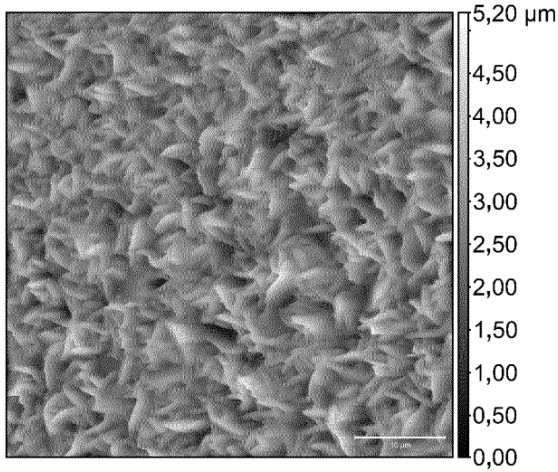
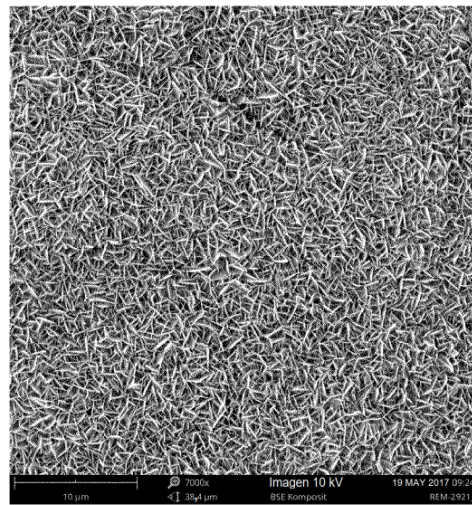
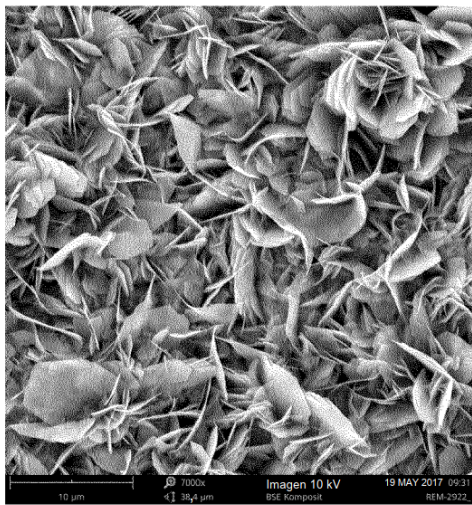
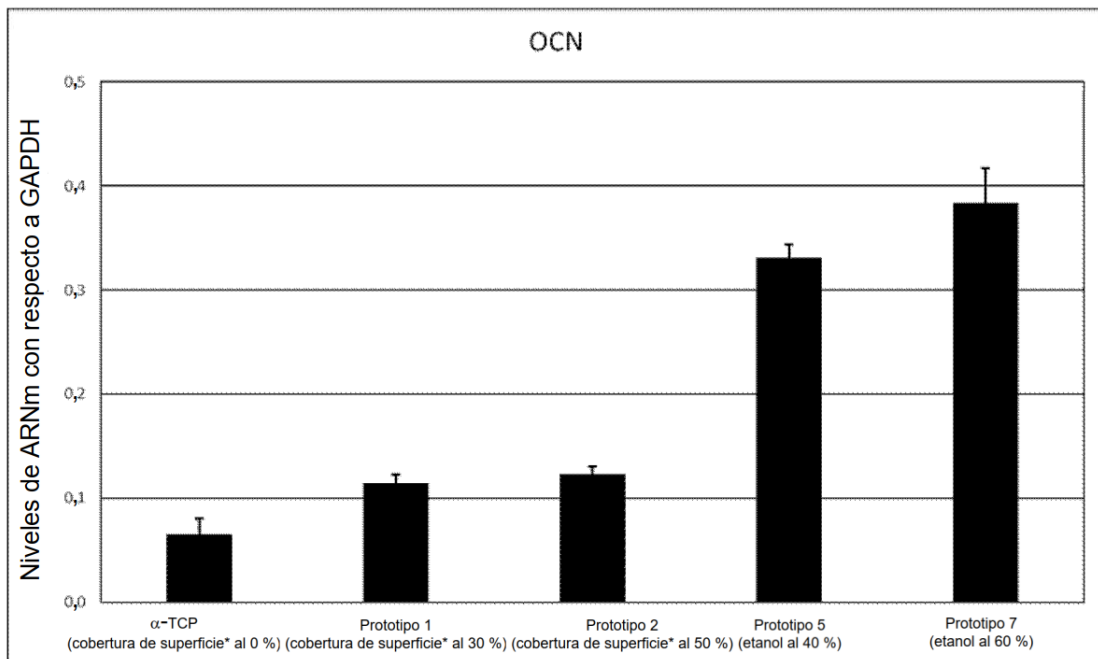
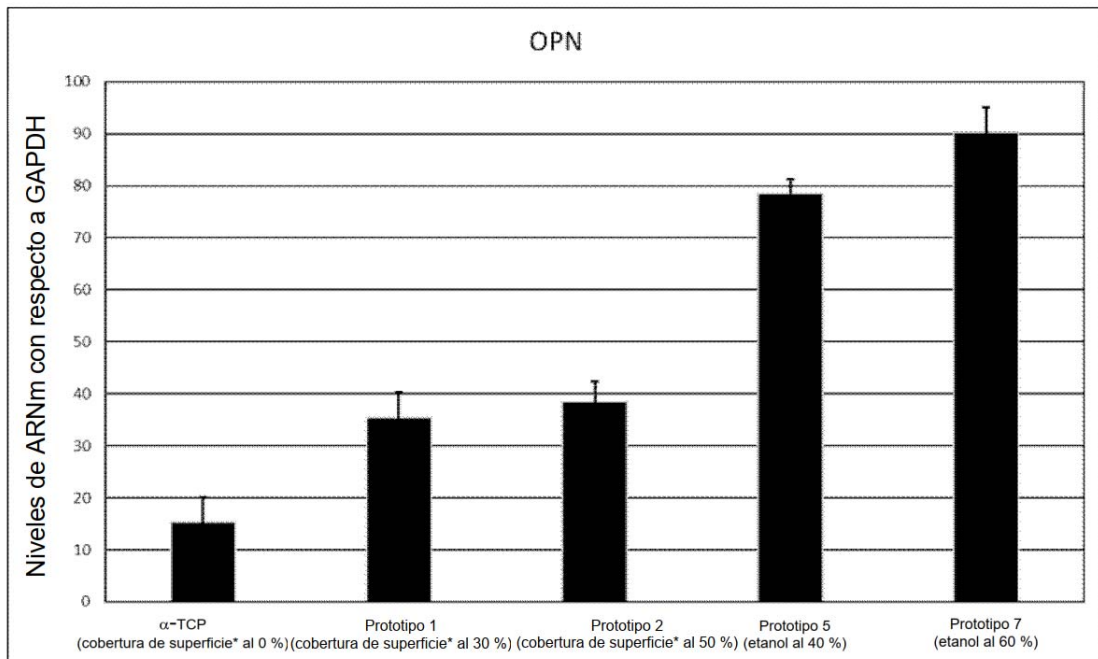


Fig. 5



*cobertura de superficie mediante agrupamientos individuales de plaquetas de cristal planas, tal como se mide mediante SEM

Fig 6

