

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 401**

51 Int. Cl.:

A61P 43/00	(2006.01)
A61L 27/00	(2006.01)
A61L 27/46	(2006.01)
A61L 27/56	(2006.01)
A61P 19/08	(2006.01)
A61P 41/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2016 PCT/JP2016/076227**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17043498**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2016 E 16844359 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3348286**

54 Título: **Complejo poroso y material de regeneración ósea**

30 Prioridad:

08.09.2015 JP 2015176454
08.09.2015 JP 2015176455

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2025

73 Titular/es:

TOYOBO CO., LTD. (100.00%)
13-1, Umeda 1-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-0001, JP

72 Inventor/es:

IWAI, ATSUSHI

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 3 012 401 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

Complejo poroso y material de regeneración ósea

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un material compuesto poroso y a un material de regeneración ósea que comprende el material compuesto poroso.

10 **Técnica anterior**

Se conocen como materiales de regeneración ósea de utilización convencional los fosfatos de calcio, tales como la hidroxiapatita (HA) (ver, por ejemplo, la literatura de patente (PTL) 2, PTL 3, PTL 4 y PTL 5).

15 En los últimos años se ha descubierto que el fosfato octacálcico (en adelante en la presente memoria denominado "OCP"), que es un precursor de la HA, presenta una alta actividad de promoción de la regeneración ósea y una alta absorbibilidad *in vivo* en comparación con otros fosfatos de calcio, tales como la HA y el β -fosfato tricálcico (β -TCP) (ver, por ejemplo, la Literatura de patente (PTL) 1). Por lo tanto, el OCP, entre los fosfatos de calcio, presenta, en particular, unas propiedades excelentes como material de regeneración ósea.

20 Sin embargo, el OCP, que es una sustancia inorgánica, presenta propiedades deficientes en lo que respecta a la impartición de forma. Por lo tanto, es difícil aplicar OCP solo para, por ejemplo, regenerar una zona con defecto óseo amplia. En vista de esta dificultad, se ha propuesto el uso de un material compuesto de OCP y colágeno como material de regeneración ósea (ver, por ejemplo, el documento PTL 1).

25 La literatura no de patente (NPL) 1 y NPL 2 divulgan que un material compuesto de OCP y colágeno es útil como material de regeneración ósea en perros y seres humanos, respectivamente. En el estudio del material compuesto de OCP y colágeno como material de regeneración ósea sólo se utilizaron partículas de OCP que presentaban un tamaño de partícula de 300 a 500 μm .

30 La literatura no de patente (NPL) 3 divulga una comparación de un material compuesto implantado *in vivo* de OCP y colágeno y un material poroso implantado *in vivo* que consiste sólo en colágeno en lo que respecta a la regeneración ósea. El documento NPL 3 divulga que con un material poroso que consiste sólo en colágeno no se produce una regeneración ósea suficiente.

35 **Listado de referencias**

Literatura de patente

40 PTL 1: documento JP2006-167445A
PTL 2: documento JP2010-273847A
PTL 3: documento JP2003-260124A
PTL 4: documento JP2009-132601A
45 PTL 5: documento JP2005-279078A
PTL 6: documento JPH5-070113A

Literatura no de patente (NPL)

50 NPL 1: Clinical Implant Dentistry and Related Research, Vol. 13, Nº 2, páginas 112 a 123, 2011
NPL 2: Tissue Engineering Part A, Vol. 20, Nº 7 a 8, páginas 1336 a 1341, 2014
NPL 3: Tissue Engineering Part A, Vol. 15, Nº 1, páginas 23 a 32, 2009

Sumario de la invención

55 Problema técnico

Es conocido que el OCP, cuando se implanta *in vivo*, se convierte en una hidroxiapatita bioanalógica y muestra una excelente osteoconducción, es decir, promueve la formación ósea mediante la activación de los osteoblastos presentes en el tejido óseo. Se ha informado de que el propio OCP implantado presenta realmente bioabsorbibilidad *in vivo* y promueve la regeneración ósea. Asimismo se ha informado de que el OCP posee una mayor capacidad para promover la diferenciación osteoblástica a partir de preosteoblastos que la HA. En un material de regeneración ósea que comprende un material compuesto de OCP y colágeno, el OCP asimismo presenta bioabsorbibilidad y posee una excelente capacidad para promover la regeneración ósea y la diferenciación osteoblástica tal como se ha descrito anteriormente. No obstante, la regeneración ósea precisa un periodo de tiempo relativamente largo, es decir, de varias semanas a varios meses, aunque puede variar

dependiendo del sitio, el tamaño, la forma, etc., del defecto óseo. Para que muestre osteoconducción a largo plazo, se considera que es importante impartir propiedades de efecto mantenido al OCP.

En materiales compuestos porosos que comprenden OCP y colágeno, hasta la fecha no se ha realizado ningún análisis que se centre en la relación entre partículas aglomeradas de OCP y una dispersión uniforme. En consecuencia, un objetivo de la presente invención es proporcionar un material compuesto poroso que comprenda OCP y colágeno en el que el OCP se dispersa uniformemente y a la vez el OCP se mantiene en forma de partículas aglomeradas grandes. Otro objetivo es proporcionar un material de regeneración ósea que comprenda el material compuesto poroso.

Solución al problema

A partir del problema anterior, los presentes inventores llevaron a cabo una amplia investigación y descubrieron que puede obtenerse un material compuesto poroso que presenta una excelente dispersabilidad uniforme del OCP y que comprende OCP y colágeno en un estado suficientemente mezclado mediante el control del nivel de agitación dentro de un intervalo específico cuando se realiza una etapa de mezclado de OCP y colágeno en el proceso de producción de un material compuesto poroso que comprende OCP y colágeno. Como resultado de investigaciones y mejoras adicionales, los presentes inventores proporcionan invenciones representadas por lo siguiente.

Un material compuesto poroso que comprende fosfato octacálcico y colágeno, caracterizado por que

en una imagen obtenida mediante una ampliación de 15 veces de un intervalo de 5.0 mm × 5.0 mm de un plano del material compuesto poroso con un microscopio electrónico de barrido (SEM),

las partículas aglomeradas de fosfato octacálcico presentan una dimensión fractal (D) igual o superior a 0.70; y

el área de las partes (c) que consisten en colágeno representa 5% o menos del área total de unas partes (a) que consisten en partículas aglomeradas de fosfato octacálcico, unas partes (b) que consisten en micropartículas de fosfato octacálcico y colágeno y las partes (c) que consisten en colágeno; y

el material compuesto se puede obtener mediante el control del nivel de agitación dentro de un intervalo específico cuando se realiza una etapa de mezclado de fosfato octacálcico y colágeno en el proceso de producción de un material compuesto poroso que comprende el fosfato octacálcico y el colágeno mediante el amasado de colágeno y fosfato octacálcico utilizando un agitador con impulsor y realizando la agitación a 100 a 300 rpm durante 15 a 300 segundos o utilizando un mezclador rotatorio y giratorio y realizando la agitación a 500 a 1500 rpm durante 30 a 300 segundos.

Además, se proporciona un material de regeneración ósea que comprende el material compuesto poroso.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, las partículas aglomeradas de OCP, que presentan un tamaño de partícula grande, y las micropartículas de OCP, están dispersadas uniformemente. Esto puede evitar fluctuaciones en la osteoconducción derivadas de la no uniformidad del material compuesto poroso, y puede esperarse que el OCP ejerza un efecto excelente de promoción de la regeneración ósea a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Además, debido a la dispersión uniforme del OCP, el material compuesto poroso obtenido puede presentar un módulo de compresión (módulo de Young) más elevado. Por lo tanto, se puede proporcionar un material compuesto poroso que presente una excelente procesabilidad y que presente menos probabilidad de dañarse. Asimismo, se puede proporcionar un material de regeneración ósea que comprenda el material compuesto poroso.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una imagen SEM para observación del material compuesto poroso obtenido en el ejemplo 1.

La figura 2 es una imagen SEM para observación del material compuesto poroso obtenido en el ejemplo comparativo 3.

La figura 3 es una imagen de análisis usada para calcular la dimensión fractal y la proporción de partículas en el ejemplo 1.

La figura 4 es una imagen de análisis utilizada para calcular la dimensión fractal y la proporción de partículas en el ejemplo comparativo 3.

La figura 5 es un gráfico que representa una curva de tensión-deformación obtenida mediante la medición del módulo de compresión del material compuesto poroso obtenido en el ejemplo 1.

La figura 6 es una ilustración de una muestra histológica teñida de un sitio con defecto óseo tratado con el material compuesto poroso obtenido en el ejemplo 1. El lado superior es el lado de la piel, y el lado inferior es el lado de la duramadre.

La figura 7 es una ilustración de una muestra histológica teñida de un sitio con defecto óseo tratado con el material compuesto poroso obtenido en el ejemplo 2. El lado superior es el lado de la piel, mientras que el lado inferior es el lado de la duramadre.

La figura 8 es una ilustración de una muestra histológica teñida de un sitio de defecto óseo tratado con el material compuesto poroso obtenido en el ejemplo comparativo 3. El lado superior es el lado de la piel, mientras que el lado inferior es el lado de la duramadre.

La figura 9 es una ilustración de una muestra histológica teñida de un sitio de defecto óseo tratado con el material compuesto poroso obtenido en el ejemplo comparativo 3. El lado superior es el lado de la piel, mientras que el lado inferior es el lado de la duramadre.

La figura 10 es una ilustración de una muestra histológica teñida de un sitio de defecto óseo tratado con el material compuesto poroso obtenido en el ejemplo comparativo 4. El lado superior es el lado de la piel, mientras que el lado inferior es el lado de la duramadre.

Descripción de formas de realización

Material compuesto poroso

El material compuesto poroso de la presente invención es un material compuesto poroso que comprende OCP y colágeno (un material compuesto de OCP/colágeno). Una forma de realización preferida del material compuesto poroso de la presente invención es un material compuesto poroso en el que el colágeno presenta una estructura tridimensional esponjiforme y están presentes partículas finas de OCP en la estructura esponjiforme, aunque haya presencia de partículas aglomeradas de OCP con un tamaño por lo menos igual a 100 µm o superior. El material de regeneración ósea que comprende el material compuesto poroso de la presente invención, que presenta una estructura porosa, permite que los osteoblastos migren al material compuesto poroso, formando así un hueso interno que promueve la formación de hueso nuevo.

El OCP ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) se puede preparar por medio de diversos procedimientos conocidos. Por ejemplo, el OCP se puede preparar por medio del procedimiento de gota de LeGeros (LeGeros R.Z., Calcif Tissue Int 37: 194-197, 1985) o el procedimiento que utiliza un aparato de síntesis (tubería de tres vías) divulgado en el documento PTL 6. Alternativamente, el OCP se puede preparar mediante un procedimiento de mezclado. Específicamente, el OCP se puede obtener, por ejemplo, mezclando una solución acuosa de dihidrogenofosfato de sodio y una solución acuosa de acetato de calcio en condiciones apropiadas y recogiendo el precipitado generado. Preferentemente, el OCP obtenido a partir del precipitado se seca, se pulveriza utilizando un molino eléctrico o similar, y se usa en forma de un polvo particulado. El tamaño de partícula se encuentra preferentemente en el intervalo de 10 a 1000 µm, más preferentemente de 100 a 500 µm, y todavía más preferentemente de 300 a 500 µm. El tamaño de partícula puede clasificarse, por ejemplo, mediante tamizado basándose en el tamaño de las aberturas de los tamices.

La fuente, propiedades, etc., del colágeno no están particularmente limitadas. Se pueden utilizar diversos colágenos. Preferentemente se usa colágeno solubilizado con enzimas que se obtiene mediante la solubilización de colágeno con una proteasa (por ejemplo, pepsina o pronasa) y del que se han eliminado telopéptidos. El tipo de colágeno es preferentemente colágeno de tipo I, tipo II, tipo III o tipo IV, que son colágenos fibrosos. Se prefiere particularmente el colágeno de tipo I, que es abundante *in vivo*, o una mezcla de colágeno de tipo I y colágeno de tipo III. La materia prima del colágeno no está particularmente limitada. Se puede utilizar preferentemente colágeno derivado de la piel, huesos, tendones o similares de cerdos o vacas, escamas de pescado, etc. El colágeno, que es un componente derivado de un organismo, presenta una característica de alta seguridad. En particular, el colágeno solubilizado con enzimas es asimismo menos alergénico y, por lo tanto, es particularmente preferido. Asimismo se puede usar colágeno disponible comercialmente.

La relación de mezcla de OCP con respecto a colágeno en el material compuesto poroso de la presente invención puede ajustarse apropiadamente según las propiedades de impartición de forma, operabilidad, biocompatibilidad, etc., deseadas. Por ejemplo, la relación de mezcla de fosfato de calcio con respecto a 1 parte en peso de colágeno es preferentemente de 0.5 a 35 partes en peso, más preferentemente de 1 a 20 partes en peso, y todavía más preferentemente de 2 a 10 partes en peso. Si la cantidad de OCP es inferior a 0.5 partes en peso por parte en peso de colágeno, el material compuesto obtenido puede presentar una función de regeneración ósea deficiente. Si la cantidad de OCP es superior a 35 partes en peso, pueden obtenerse como resultado propiedades de impartición de forma deficientes.

Una característica del material compuesto poroso de la presente invención es que en una imagen obtenida ampliando un intervalo de 5.0 mm × 5.0 mm de un plano del material compuesto poroso 15 veces con un microscopio electrónico de barrido (SEM), las partículas aglomeradas de OCP presentan una dimensión fractal (D) igual o superior a 0.70, y preferentemente igual o superior a 0.80. Una mayor dimensión fractal (D) indica un mejor estado dispersado de las partículas aglomeradas de OCP.

Si la dimensión fractal (D) es inferior a 0.60, puede no producirse una osteoconducción uniforme en el sitio en el que se aplica el material compuesto poroso. Además, no puede esperarse un efecto mantenido del OCP. En particular, para promover de forma continua la osteoconducción a lo largo de un periodo de varias semanas a varios meses requerido para la regeneración ósea, la presencia uniforme de partículas aglomeradas grandes, que evita que el OCP desaparezca pronto, se considera importante. El OCP asimismo opera reforzando la resistencia de la estructura esquelética del colágeno en el material compuesto poroso. Tal como se describe a continuación, una dimensión fractal inferior de las partículas aglomeradas de OCP reduce el módulo de compresión. Un módulo de compresión bajo da como resultado una menor facilidad operativa para rellenar un sitio con defecto óseo. Cuando un sitio con defecto óseo se rellena con el material compuesto poroso de la presente invención, el colapso del material compuesto poroso o el aplastamiento de los poros, si se produce, afectaría negativamente a la regeneración ósea posterior. Específicamente, la dimensión fractal (D) se calcula de la forma siguiente.

Imagen SEM del material compuesto poroso

Se toma una fotografía en sección transversal del material compuesto poroso con un microscopio electrónico de barrido (SEM) de tal manera que la fotografía incluya por lo menos un intervalo cuadrado de 5.0 mm × 5.0 mm que es un plano del material compuesto poroso. Las condiciones de la fotografía son las siguientes:

voltaje de aceleración: 15.0 kV,
vacío bajo (30 Pa),
detección electrónica retrodispersada,
distancia de trabajo (WD): 40 mm,
aumento: × 15.

Cuando el material compuesto poroso presenta un plano de por lo menos 5.0 mm × 5.0 mm en su superficie exterior, la superficie puede fotografiarse. El plano de 5.0 mm × 5.0 mm que se va a fotografiar puede ser una sección transversal del material compuesto poroso. En este caso, se puede fotografiar una superficie de corte lisa del material compuesto poroso. La superficie que se va a fotografiar es preferentemente una superficie sin recubrimiento o similar. Por ejemplo, cuando la superficie exterior del material compuesto poroso presenta un recubrimiento, se fotografía una sección transversal obtenida realizando un corte de tal manera que el área que se va a fotografiar no incluya la capa de recubrimiento. Las muestras son preferentemente de un espesor uniforme. Para evitar la rotura de las muestras, las muestras poseen preferentemente un espesor por lo menos igual a 0.5 mm o superior. Cada muestra puede fotografiarse después de cortar el material compuesto poroso en un tamaño de 5.0 mm × 5.0 mm. No obstante, preferentemente, cada muestra que presenta una dimensión que incluye un intervalo cuadrado de 5.0 mm × 5.0 mm se prepara y se fotografía con un SEM, y después se puede designar un intervalo de 5.0 mm × 5.0 mm en la imagen fotografiada.

Dimensión fractal (D)

La dimensión fractal (D) se calcula mediante el siguiente procedimiento. Todas las etapas de procesamiento de imágenes mostradas a continuación se realizan utilizando un programa informático de procesamiento de imágenes ImageJ (versión 1.48 o posterior).

- (1) Capturar una imagen SEM en la que se designa un intervalo cuadrado de 5.0 mm × 5.0 mm (en adelante en la presente memoria denominada "imagen de análisis" en este párrafo) en ImageJ.
- (2) Umbralizar la imagen de análisis para obtener una imagen binaria (valor umbral: 90 píxeles).
- (3) Invertir los tonos de color.
- (4) Dividir la imagen de análisis en n^2 bloques ($n = 2, 3, 4, 5$).
- (5) Para cada bloque obtenido dividiendo la imagen de análisis en n^2 , calcular la fracción de área del área ocupada por partículas aglomeradas de OCP con respecto a la totalidad del área del bloque.
- (6) Para la imagen de análisis dividida en n^2 bloques, calcular la fracción de área promedio (μ_n) de todos los bloques y la desviación estándar (δ_n).
- (7) Calcular $D(n)$ mediante la fórmula siguiente.

$$D(n) = \delta_n / \mu_n$$

(8) Graficar $D(n)$ y $1/n$ en un gráfico doble logarítmico para obtener la pendiente de una línea de aproximación (aproximación de potencia).

5

(9) Determinar una dimensión fractal (D) multiplicando la pendiente de la línea de aproximación por -1 .

La etapa (4) puede realizarse antes de la etapa (2). La etapa (4) puede realizarse mediante un programa informático de procesamiento de imágenes distinto de ImageJ, tal como Windows Paint. Cuando la binarización de la etapa (2) no se puede realizar debido a los tonos de color de la imagen SEM, o cuando las partes no ocupadas por partículas aglomeradas de OCP se confunden con las partes ocupadas por partículas aglomeradas de OCP, se pueden embadurnar en primer lugar de negro sólo las partes que contienen las partículas aglomeradas de OCP y las otras partes pueden estar en color blanco, o se pueden embadurnar de blanco sólo las partes ocupadas por partículas aglomeradas y las otras partes pueden estar en color negro. La imagen se captura entonces en ImageJ y se somete a la etapa (2) y etapas posteriores. Cuando se embadurna de negro sólo las partículas aglomeradas de OCP y las otras partes están en color blanco, la etapa (3) de inversión de los tonos de color es innecesaria.

10

15

Proporción de partículas aglomeradas de OCP

El material compuesto poroso de la presente invención es tal que en una imagen obtenida mediante una ampliación de 15 veces de un intervalo de $5.0 \text{ mm} \times 5.0 \text{ mm}$ de un plano del material compuesto poroso con un microscopio electrónico de barrido (SEM), la fracción de área del área ocupada por partículas aglomeradas de OCP con respecto al área total, establecida en 1, es preferentemente igual o superior a 0.05 pero igual o inferior a 0.40, más preferentemente igual o superior a 0.10 pero igual o inferior a 0.30, y todavía más preferentemente igual o superior a 0.15 pero igual o inferior a 0.25. La fracción de área de las partículas aglomeradas de OCP puede obtenerse a partir de la fracción de área del área ocupada por las partículas aglomeradas de OCP con respecto al área de cada bloque calculada en el proceso de cálculo de la dimensión fractal (D).

20

25

Proporción de partículas aglomeradas de $300 \mu\text{m}$ o más

En la presente invención, el área de las partículas aglomeradas de OCP que presentan una longitud igual o superior a $300 \mu\text{m}$ representa preferentemente 75% o más, más preferentemente 85% o más, y todavía más preferentemente 90% o más, del área total de las partículas aglomeradas de OCP. La presencia de partículas aglomeradas relativamente grandes de $300 \mu\text{m}$ o más en una proporción específica o superior puede promover de forma continua la osteoconducción durante un largo periodo de tiempo, y asimismo desempeña un papel importante en el refuerzo de la resistencia de la estructura esquelética del colágeno del material compuesto poroso. El área total de las partículas aglomeradas de OCP en la presente memoria se refiere al total de las áreas ocupadas por todas las partículas visualmente detectables en la imagen SEM anterior. Presentar una longitud igual o superior a $300 \mu\text{m}$ significa que, en la imagen SEM, la distancia entre una línea tangente al contorno de una partícula aglomerada y otra línea tangente dibujada de forma paralela a la primera línea tangente de modo que se obtenga el intervalo más largo entre las mismas es igual o superior a $300 \mu\text{m}$.

30

35

40

Específicamente, la proporción de las partículas aglomeradas de $300 \mu\text{m}$ o más se calcula mediante el siguiente procedimiento.

45

(1) Capturar una imagen SEM en la que se designa un intervalo cuadrado de $5.0 \text{ mm} \times 5.0 \text{ mm}$ (en adelante en la presente memoria denominado "imagen de análisis" en este párrafo) en ImageJ.

50

(2) Umbralizar la imagen de análisis para obtener una imagen binaria (valor umbral: 90 píxeles).

(3) Invertir los tonos de color.

(4) Determinar el área total de partículas aglomeradas de OCP.

55

(5) Extraer partículas aglomeradas de OCP que presentan una longitud igual o superior a $300 \mu\text{m}$.

(6) Calcular la proporción de partículas aglomeradas de OCP que presentan una longitud de $300 \mu\text{m}$ (R_d) a partir del área total de partículas aglomeradas de OCP (S_w) y el área de partículas aglomeradas de OCP que presentan una longitud de $300 \mu\text{m}$ (S_d) según la fórmula siguiente.

60

$$R_d = S_d / S_w \times 100$$

Cuando la binarización en (2) no se puede realizar debido a los tonos de color de la imagen SEM, o cuando las partes no ocupadas por partículas de OCP aglomeradas se confunden con las partes ocupadas por partículas de OCP aglomeradas, se pueden embadurnar en primer lugar de negro sólo las partes ocupadas por partículas aglomeradas de OCP y las otras partes están en color blanco, o se pueden embadurnar en primer lugar de blanco

65

sólo las partes ocupadas por partículas aglomeradas de OCP y las otras partes pueden estar en color negro. La imagen resultante se captura entonces en ImagenJ y se somete a la etapa (2) y etapas posteriores. Cuando se embadurnan de negro sólo las partes ocupadas por las partículas aglomeradas de OCP y las otras partes están en color blanco, la etapa (3) de inversión de los tonos de color es innecesaria.

5

Porcentaje de área de las partes que consisten en colágeno

El material compuesto poroso de la presente invención es tal que en una imagen obtenida ampliando un intervalo de 5.0 mm × 5.0 mm de un plano del material compuesto poroso 15 veces con un microscopio electrónico de barrido (SEM), el área de partes c) que consisten en colágeno representa 5% o menos del área total de partes a) que consisten en partículas aglomeradas de fosfato octacálcico, partes b) que consisten en micropartículas de fosfato octacálcico y colágeno, y las partes c) que consisten en colágeno.

10

El material compuesto poroso según una forma de realización preferida de la presente invención comprende partes a) que consisten en partículas aglomeradas de OCP, partes b) que consisten en micropartículas de OCP y colágeno, y partes c) que consisten en colágeno. Entre las mismas, las partes a) que consisten en partículas aglomeradas de OCP se refieren a partes en las que puede confirmarse a simple vista la presencia de agregados y partículas de fosfato de calcio en una imagen SEM ampliada 15 veces del material compuesto poroso. En la imagen SEM, las partes a) se representan habitualmente en un color cercano al blanco. Cuando las partes a) se someten a análisis elemental, se detectan grandes cantidades de calcio Ca y fósforo P. Las partes b) que consisten en micropartículas de OCP y colágeno se refieren a partes en las que partículas finas de OCP de menos de 100 µm o similares están presentes en una estructura de colágeno esponjiforme, y es difícil confirmar a simple vista la presencia de micropartículas de OCP en una imagen de SEM ampliada 15 veces. En la imagen SEM, las partes b) que consisten en micropartículas de OCP y colágeno son normalmente menos brillantes que las partes a) que consisten en partículas aglomeradas de OCP y están representadas en color gris a blanco. Cuando las partes b) se someten a análisis elemental, se detectan carbono C, calcio Ca y fósforo P. Las partes c) que consisten en colágeno se refieren a partes en las que sólo están presentes trazas de micropartículas de OCP o no hay presencia de ninguna micropartícula de OCP en una estructura de colágeno esponjiforme. En la imagen SEM, las partes c) que consisten en colágeno se representan en un color oscuro cercano al negro. Cuando las partes c) se someten a análisis elemental, se detecta carbono C y apenas se detectan calcio Ca y fósforo P.

15

20

25

30

El porcentaje de área de las partes que consisten en colágeno se determina mediante el siguiente procedimiento.

35

(1) Capturar una imagen SEM en la que se designa un intervalo cuadrado de 5.0 mm × 5.0 mm (en adelante en la presente memoria denominado "imagen de análisis" en este párrafo) en ImageJ.

(2) Binarizar la imagen de análisis (valor umbral: 90 píxeles).

40

(3) Extraer las partes que consisten en colágeno.

(4) Calcular el área de las partes de colágeno (S_c).

(5) Calcular el área de la imagen de análisis (S_A).

45

(6) Calcular el porcentaje de área de las partes que consisten en colágeno (R_c) mediante la fórmula siguiente.

$$R_c = S_c / S_A \times 100$$

50

Cuando la binarización de la etapa (2) no se puede realizar debido a los tonos de color de la imagen SEM, o cuando las partes que consisten en colágeno se confunden con las partes distintas de las partes que consisten en colágeno, se pueden embadurnar en primer lugar de negro sólo las partes que consisten en colágeno y las otras partes pueden estar en color blanco, o se pueden embadurnar de blanco sólo las partes que consisten en colágeno y las otras partes pueden estar en color negro. La imagen resultante se captura entonces en ImagenJ y se somete a la etapa (2) y etapas posteriores. Cuando se embadurnan de blanco sólo las partes que consisten en colágeno y las otras partes están en color negro, la etapa de inversión de los tonos de color es necesaria entre los procesos (2) y (3).

55

60

El porcentaje de área de las partes que consisten en colágeno es de 5% o inferior, preferentemente de 4% o inferior, y todavía más preferentemente de 3% o inferior, con respecto al área total de la imagen de análisis. Cuando las partes que consisten en colágeno representan más de 5%, el material compuesto poroso presenta una estructura no uniforme y puede presentar una osteoconducción reducida. Además, cuando las partes que consisten en colágeno representan más de 5%, el módulo de compresión se reduce significativamente.

65

En el material compuesto poroso de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, en una imagen obtenida ampliando un intervalo de 5.0 mm × 5.0 mm de un plano del material compuesto poroso 15 veces con un microscopio electrónico de barrido (SEM),

las partículas aglomeradas de OCP presentan una dimensión fractal (D) igual o superior a 0.70; y

5 la imagen incluye partes a) que consisten en partículas aglomeradas de fosfato octacálcico, partes b) que consisten en micropartículas de fosfato octacálcico y colágeno, y partes c) que consisten en colágeno, y el área de las partes c) que consisten en colágeno representa 5% o menos de la imagen.

10 Se prefiere que el área de partículas aglomeradas que presentan una longitud igual o superior a 300 μm represente 75% o más del área total de las partículas aglomeradas de OCP.

Más preferentemente, el área de partículas aglomeradas que presentan una longitud igual o superior a 300 μm representa 85% o más. De forma incluso más preferida, la dimensión fractal (D) es igual o superior a 0.80 y el área de partículas aglomeradas que presentan una longitud igual o superior a 300 μm representa 90% o más.

15 Módulo de compresión

El material compuesto poroso presenta preferentemente un módulo de compresión igual o superior a 0.05 MPa, más preferentemente de 0.08 a 0.30 MPa, y todavía más preferentemente de 0.10 a 0.20 MPa. Cuando la resistencia a la compresión es inferior a 0.05 MPa, la trabajabilidad del material compuesto poroso tiende a reducirse. En otras palabras, cuando un sitio con defecto óseo se rellena con el material compuesto poroso de la presente invención, el colapso del material compuesto poroso o el aplastamiento de los poros, si se produce, afectaría negativamente a la regeneración ósea posterior. Aunque el límite superior del módulo de compresión no se especifica particularmente, es preferentemente de 0.30 MPa o inferior en términos de facilidad operativa para rellenar un sitio de defecto óseo.

25 El módulo de compresión en la presente invención se mide mediante el procedimiento siguiente.

30 Una muestra cilíndrica que presenta un diámetro de 8.5 mm y una longitud de 15 mm se sumerge en una solución salina tamponada con fosfato (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 0.14 M, pH 7.4) a una temperatura de 25 °C y una humedad del 65% durante 30 minutos. El agua presente sobre la superficie de la muestra se seca después suavemente. Se aplica una carga uniaxial a la muestra utilizando un probador universal de precisión (Autograph AGS-J, producido por Shimadzu Corporation, capacidad de celda de carga: 1 kN). Específicamente, después de que una muestra se fije de tal manera que el lado largo de la muestra sea perpendicular a una platina inferior (material: acero inoxidable, diámetro interno: 100 mm, espesor: 25 mm), se hace descender una platina superior (material: acero inoxidable, diámetro interno: 100 mm, espesor: 25 mm) a una velocidad de 10 mm/min. Cuando la muestra se deforma en un 80%, se detiene el probador. El módulo de compresión se calcula a partir de la pendiente de la parte lineal inicial de la curva de tensión-deformación obtenida.

40 El material compuesto poroso de la presente invención presenta preferentemente un tamaño de poro de 3 a 40 μm . Si el tamaño de poro es superior a 40 μm , la resistencia del material compuesto poroso tiende a reducirse. Por otra parte, si el tamaño de poro es inferior a 3 μm , es difícil que las células metabólicas óseas, tales como los osteoblastos, migren al material compuesto poroso, y puede reducirse el efecto de promoción de la regeneración ósea. El material compuesto poroso de la presente invención presenta más preferentemente un tamaño de poro de 5 a 20 μm .

45 El tamaño de poro se mide mediante medición de la distribución de poros utilizando un porosímetro de mercurio. Específicamente, se mide mediante el procedimiento siguiente.

50 Medición del tamaño de poro

Como pretratamiento, las muestras se secan a una temperatura constante de 120 °C durante 4 horas. Para cada una de las muestras después del pretratamiento, la distribución de poros de poros que presentan un diámetro de 0.0018 a 200 μm se determina en las siguientes condiciones mediante el procedimiento de intrusión de mercurio utilizando el dispositivo de medición siguiente.

55 Dispositivo de medición: AutoPore IV 9520 (producido por Micromeritics)

Condiciones de medición:

60 Ángulo de contacto entre el mercurio y la muestra: 140°
Tensión superficial del mercurio: 0.48 N/m (convertida por 1 dina = 10⁻⁵ N)

65 El tamaño de poro en la presente invención se refiere a un valor de tamaño de microporo que muestra el valor máximo del pico que presenta el área más grande en la curva de distribución de poros obtenida a partir de la presión medida mediante el procedimiento de intrusión de mercurio.

La porosidad (relación de huecos) del material compuesto poroso es preferentemente de 80 a 99%, y más preferentemente de 85 a 98%. La porosidad se determina mediante la fórmula siguiente a partir del volumen de poros total medido mediante el procedimiento de intrusión de mercurio y la densidad aparente.

$$5 \quad \text{Porosidad (\%)} = \text{volumen de poros total} / \{ (1/\text{densidad aparente}) + \text{volumen de poros total} \} \times 100$$

La forma del material compuesto poroso de la presente invención es preferentemente un paralelepípedo rectangular (cuerpo de bloque), un cilindro, un comprimido o un gránulo. Cuando el material compuesto poroso es un paralelepípedo rectangular, el material compuesto poroso presenta preferentemente un tamaño superior o igual a 5 mm × 5 mm × 5 mm. En general, el límite superior se encuentra preferentemente en el intervalo de 100 mm × 100 mm × 100 mm. El paralelepípedo rectangular no está limitado a un cubo. Cuando el material compuesto poroso es cilíndrico, el material compuesto poroso presenta preferentemente un diámetro de 5 a 50 mm y una altura en el intervalo de 1 a 50 mm. Cuando el material compuesto poroso es granular, la forma del gránulo no se limita a esferas, y puede ser indefinida; sin embargo, el material compuesto poroso presenta preferentemente un diámetro de 0.1 a 10 mm.

El material compuesto poroso de la presente invención se usa para rellenar un sitio de defecto óseo con el material compuesto poroso. Cuando hay suficiente sangre o fluido corporal presente en el sitio de defecto óseo, el sitio de defecto óseo puede rellenarse con el material compuesto poroso tal cual, o después de cortar el material compuesto poroso en una forma apropiada. Cuando no hay presente suficiente sangre o similar en el sitio de defecto óseo, o cuando el material compuesto poroso no puede usarse en su forma original para rellenar el sitio de defecto óseo con el mismo, el sitio de defecto óseo puede rellenarse con el material compuesto poroso después de que el material compuesto poroso se sumerja en sangre, solución salina fisiológica o similar y se confirme que el material compuesto poroso presenta una elasticidad similar a una esponja.

Procedimiento para producir un material compuesto poroso

El procedimiento para producir el material compuesto poroso de la presente invención es un procedimiento de producción que comprende mezclar OCP con colágeno. Por ejemplo, se puede usar el siguiente procedimiento de producción.

(1) En primer lugar, se añade OCP a una solución de colágeno gelificado que presenta una concentración de 0.1 a 5% en peso y un pH de 7 a 8, y se amasa para preparar una mezcla de OCP y colágeno. (2) Posteriormente, la mezcla se moldea en un molde adecuado, se congela y se liofiliza para obtener un material compuesto. (3) El material compuesto obtenido se somete opcionalmente a un tratamiento de reticulación por deshidratación térmica, y se esteriliza adicionalmente mediante un procedimiento de esterilización convencional (por ejemplo, irradiación de rayos y, irradiación de haz de electrones, o gas de óxido de etileno).

Un conocimiento técnico común de los expertos en la materia era que se precisaba un amasado completo en la etapa de amasado de colágeno y OCP. Sorprendentemente, sin embargo, los presentes inventores descubrieron que el amasado completo reduce la dimensión fractal o la proporción de partículas de 300 μm o más. En la etapa de amasado, se pueden usar agitadores con impulsor, tales como agitadores de tipo hélice con 2 a 4 palas o agitadores de tipo paleta, o mezcladores rotatorios/giratorios. Cuando se usa un agitador con impulsor, la agitación se realiza preferentemente a 100 a 300 rpm durante 15 a 300 segundos, y más preferentemente a 100 a 300 rpm durante 30 a 120 segundos. Cuando se usa un mezclador rotatorio/giratorio, la agitación se realiza preferentemente a 500 a 1500 rpm durante 30 a 300 segundos, y más preferentemente a 500 a 1500 rpm durante 45 a 120 segundos. La etapa de amasado del colágeno y el OCP asimismo se puede realizar manualmente utilizando una espátula o similar. Asimismo en este caso, la agitación se realiza preferentemente a una velocidad constante durante 30 a 120 segundos. Preferentemente, el tiempo de agitación se ajusta apropiadamente de acuerdo con la velocidad de rotación.

El procedimiento para producir el material compuesto poroso de la presente invención comprende preferentemente una etapa de liofilización después de que un gel, sol o líquido que contiene OCP y colágeno se congele rápidamente por inmersión en un refrigerante líquido. El refrigerante líquido es un líquido que presenta una temperatura inferior a la temperatura de congelación del gel, sol o líquido que contiene OCP y colágeno. Los ejemplos de tales líquidos incluyen metanol, etanol, acetona, acetonitrilo y nitrógeno líquido. La temperatura del refrigerante líquido es preferentemente igual o inferior a -20 °C, más preferentemente igual o inferior a -40 °C, y todavía más preferentemente igual o inferior a -80 °C.

Se considera que la congelación rápida del gel, sol o líquido que contiene fosfato octacálcico y colágeno por inmersión en un refrigerante líquido reduce el tamaño de poro del material compuesto poroso resultante.

El material compuesto poroso de la presente invención se somete preferentemente a tratamiento térmico o tratamiento de reticulación deshidrotérmica. El tratamiento térmico produce el colapso de una parte de la estructura molecular del OCP, facilitando así la migración de células osteogénicas y promoviendo la regeneración ósea, a la vez que permite que el colágeno se reticule para potenciar la retención de la forma.

La temperatura del tratamiento térmico es preferentemente de 50 a 200 °C, y más preferentemente de 60 a 180 °C. El tratamiento térmico se realiza preferentemente a presión reducida. La presión es preferentemente de 0 a 3000 Pa, y más preferentemente de 0 a 300 Pa. El tiempo de tratamiento del tratamiento térmico es preferentemente de 2 horas a 10 días, y más preferentemente de 12 horas a 5 días.

El material compuesto poroso de la presente invención puede contener, además de OCP y colágeno, por ejemplo, citocina (por ejemplo, proteína morfogenética ósea 2, factor de crecimiento transformante β 1, etc.) que presenta capacidad de formación ósea. La presencia de dicha citocina puede aumentar la velocidad de regeneración ósea.

El material compuesto poroso de la presente invención puede contener además otros componentes que se usan habitualmente en este campo. Los ejemplos de tales componentes incluyen polímeros bioabsorbibles (por ejemplo, poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), copolímero de poli(ácido láctico)-polietilenglicol, etc.), fosfatos de calcio bioabsorbibles distintos de OCP (por ejemplo, β -TCP) y fosfatos de calcio no reabsorbibles (por ejemplo, hidroxiapatita).

Material de regeneración ósea

La presente invención se refiere asimismo a un material de regeneración ósea que contiene el material compuesto poroso. El material de regeneración ósea puede usarse, por ejemplo, para la reparación de defectos óseos en el sector de la cirugía oral dental y el sector de la cirugía ortopédica, y la reparación de defectos óseos después de una craneotomía o una toracotomía. Por ejemplo, en el sector de la cirugía oral dental, cuando un defecto óseo provocado por una enfermedad periodontal, una cavidad quística, una cresta alveolar atrófica, una mandíbula hendida, una cavidad de extracción dental o similares se rellena con un material de regeneración ósea que comprende el material compuesto poroso, se puede confirmar un excelente efecto de regeneración ósea después de varias semanas a varios meses. En el sector de la cirugía ortopédica, por ejemplo, en el caso de un defecto óseo después de la resección de un tumor óseo o un defecto óseo provocado por un traumatismo, tal como una fractura ósea, el sitio del defecto óseo puede rellenarse con el material de regeneración ósea de la presente invención para promover de este modo la regeneración ósea.

Ejemplos

La presente invención se describe con mayor detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos. La presente invención, no obstante, no se limita a los mismos.

Ejemplo 1

(1) Preparación de OCP

En primer lugar, se prepararon el líquido 1 y el líquido 2 para la preparación de OCP de la manera siguiente.

Líquido 1: se disolvió dihidrogenofosfato de sodio dihidratado (31.2 g) en 2500 g de agua destilada para preparar el líquido 1.

Líquido 2: se disolvió acetato de calcio monohidratado (35.2 g) en 2500 g de agua destilada para preparar el líquido 2.

Posteriormente, el líquido 1 se dispuso en un matraz separable y se calentó a 70 °C utilizando un calentador de manta. A continuación, mientras el líquido 1 se agitaba a una velocidad de 250 rpm utilizando un agitador (MAZELA Z, producido por Tokio Rikakikai Co., Ltd.) equipado con paletas de agitación (diámetro de paleta: 12 cm), se añadió líquido 2 gota a gota al líquido 1 a una velocidad de aproximadamente 28 ml/min. Después de completar la adición gota a gota, la mezcla de líquido 1 y líquido 2 se agitó adicionalmente a 70 °C a 250 rpm durante 2 horas.

Posteriormente, el precipitado producido en la mezcla anterior se filtró a través de un filtro de membrana (tamaño de poro: 3 μ m; A300A293C, producido por Advantec Toyo Kaisha, Ltd.) y se recogió. El precipitado recogido se dispersó en 1500 ml de agua destilada y se lavó mediante agitación durante 15 minutos. Dichas etapas de filtrado y lavado se repitieron adicionalmente 3 veces.

Posteriormente, el precipitado lavado se secó en un secador de temperatura constante a 30 °C durante 24 horas. El precipitado seco se molió con un molino eléctrico y después se clasificó en un tamaño de partícula de 300 a 500 μ m mediante el uso de tamices, obteniendo así un polvo. Finalmente, el polvo obtenido se sometió a esterilización por calor seco a 120 °C durante 2 horas.

(2) Preparación de material compuesto de OCP/colágeno (material compuesto poroso)

Una parte en peso de colágeno derivado de dermis de cerdo que comprende colágeno de tipo I y colágeno de tipo III (NMP Collagen PS, producido por NH Foods Ltd.) se disolvió en 200 partes en peso de agua destilada enfriada a 4 °C, obteniendo así una solución de colágeno a una concentración de aproximadamente 0.5% en peso. Mientras la temperatura de la solución se mantenía a 4 °C, se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio a la solución acuosa de colágeno, y el pH se ajustó a aproximadamente 7.4 para obtener una suspensión de colágeno. Posteriormente, la suspensión de colágeno se dispuso en un frasco de centrífuga y se centrifugó mediante un separador centrífugo (GRX-250, producido por Tomy Seiko Co., Ltd.) a una fuerza centrífuga de 7.000 × g durante 20 minutos. El sobrenadante se retiró de modo que la suspensión de colágeno resultante contuviera colágeno en una cantidad de 3% en peso, obteniendo así un gel de colágeno.

Posteriormente, después de añadir OCP (tamaño de partícula: 300 a 500 µm) al gel de colágeno en una cantidad tal que la relación en peso de OCP con respecto a colágeno fuera de 77:23, la mezcla se agitó a una velocidad de rotación de 300 rpm durante 60 segundos utilizando un agitador (MAZELA Z, producido por Tokio Rikakikai Co., Ltd.) equipado con palas de agitación (producidas por Sogo Laboratory Glass Works Co., Ltd., 4 palas, diámetro de pala: 7 cm) para obtener un gel de material compuesto de OCP/colágeno. El gel se colocó en un recipiente de plástico que presentaba un espacio interior cilíndrico (diámetro interior: 8.5 mm, volumen: aproximadamente 3.0 cm³) y se centrifugó a una fuerza centrífuga de 230 × g durante 1 minuto y se desespumó.

El recipiente se selló herméticamente y se congeló rápidamente sumergiéndolo en un gran exceso de metanol enfriado a -80 °C con respecto al volumen del producto que se iba a congelar. Después de abrir el recipiente, el producto congelado se secó en un liofilizador (-10 °C, 48 horas) y se moldeó. El producto moldeado se calentó después a 150 °C a presión reducida durante 24 horas para la reticulación deshidrotérmica. El producto cilíndrico obtenido se cortó a un espesor de 1.5 mm o 15 mm con un cuchillo quirúrgico y finalmente se irradió con haces de electrones (15 kGy) para su esterilización. Se obtuvo así un material compuesto poroso del ejemplo 1.

Ejemplo 2

Se obtuvo un material compuesto poroso en el ejemplo 2 de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que se mezclaron un gel de colágeno y OCP a una velocidad de rotación de 300 rpm durante 300 segundos utilizando un agitador con palas.

Ejemplo 3

Se obtuvo un material compuesto poroso en el ejemplo 3 de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se mezclaron un gel de colágeno y OCP a una velocidad de rotación de 1000 rpm durante 60 segundos utilizando un mezclador rotatorio/giratorio (Awateri Rentaro ARE-310, producido por Thinky Corporation).

Ejemplo comparativo 1

Se obtuvo un material compuesto poroso en el ejemplo comparativo 1 de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se mezclaron un gel de colágeno y OCP a una velocidad de rotación de 100 rpm durante 15 segundos utilizando un agitador con palas.

Ejemplo comparativo 2

Se obtuvo un material compuesto poroso en el ejemplo comparativo 2 de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se mezclaron un gel de colágeno y OCP a una velocidad de rotación de 300 rpm durante 900 segundos utilizando un agitador con palas.

Ejemplo comparativo 3

Se obtuvo un material compuesto poroso en el ejemplo comparativo 3 de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se mezclaron un gel de colágeno y OCP a una velocidad de rotación de 300 rpm durante 15 segundos utilizando un mezclador rotatorio/giratorio.

Ejemplo comparativo 4

Se obtuvo un material compuesto poroso en el ejemplo comparativo 4 de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto que se mezclaron un gel de colágeno y OCP a una velocidad de rotación de 2000 rpm durante 900 segundos utilizando un mezclador rotatorio/giratorio.

Análisis de imágenes

El análisis de imágenes se realizó en imágenes SEM mediante observación de una sección transversal de cada muestra preparada cortando a un espesor de 1.5 mm en las condiciones siguientes. El intervalo de análisis se

ES 3 012 401 T3

encontraba dentro de un área cuadrada de aproximadamente 5 mm libremente seleccionada a partir de la sección transversal de la muestra (en adelante denominada imagen de análisis), que se utilizó para el análisis.

- 5 Aparato de medición: SU1510, producido por Hitachi Ltd.
Condiciones de medición: voltaje de aceleración de 15 kV a vacío bajo (30 Pa)
Observación por microscopía electrónica de reflexión
WD: 40 mm
Ampliación: × 15

10 Dimensión fractal

La dimensión fractal (D) se utilizó para cuantificar el grado de dispersión de las partículas de OCP en una matriz de colágeno. La dimensión fractal (D) se calculó mediante el procedimiento siguiente: Todas las etapas de procesamiento de imágenes mostradas a continuación se realizaron utilizando el programa informático de procesamiento de imágenes ImageJ.

- 15
1. Capturar una imagen de análisis.
 2. Binarizar la imagen de análisis (umbral: 90 píxeles).
 3. Invertir los tonos de color.
 - 20 4. Dividir la imagen de análisis en n^2 bloques ($n = 2, 3, 4, 5$).
 5. Para cada bloque, calcular la fracción de área de la imagen que representa partículas de OCP.
 6. En cada nivel de división, calcular la fracción de área promedio (μ_n) y la desviación estándar (δ_n).
 7. Calcular $D(n)$ mediante la fórmula siguiente:

25
$$D(n) = \delta_n / \mu_n$$

8. Graficar $D(n)$ y $1/n$ en un gráfico doble logarítmico para obtener la pendiente de una línea de aproximación.
9. Multiplicar la pendiente de la línea de aproximación por -1 para obtener una dimensión fractal (D).

30 Proporción de partículas de OCP de 300 μm o más

La proporción de partículas de OCP de 300 μm o más se calcula mediante el procedimiento siguiente:

- 35
1. Capturar una imagen de análisis.
 2. Binarizar la imagen de análisis (umbral: 90 píxeles).
 3. Invertir los tonos de color.
 4. Determinar el tamaño de partícula.
 5. Extraer partículas de OCP de 300 μm o más.
 6. Calcular el área total de partículas (S_w) y el área de partículas de OCP de 300 μm o más (S_d).
 - 40 7. Calcular la proporción de partículas de OCP de 300 μm o más (R_d) con la fórmula siguiente:

$$R_d = S_d / S_w \times 100$$

45 El tamaño de partícula en esta medición se define como la distancia entre una línea tangente al contorno de una partícula aglomerada y otra línea tangente dibujada de forma paralela a la primera línea tangente de modo que se obtenga el intervalo más largo entre las mismas, que es igual o superior a 300 μm .

Proporción de partes de colágeno

50 Como índice para evaluar si el OCP y el gel de colágeno se han mezclado suficientemente, se calcula la proporción de partes de colágeno a partir de la imagen de análisis. La proporción de partes de colágeno se calculó mediante el procedimiento siguiente:

- 55
1. Capturar una imagen de análisis.
 2. Binarizar la imagen de análisis (umbral: 90 píxeles).
 3. Extraer las partes de colágeno.
 4. Calcular el área de las partes de colágeno (S_c).
 5. Calcular el área de la imagen de análisis (S_A).
 6. Calcular el porcentaje de área de las partes de colágeno (R_c) con la fórmula siguiente:

60
$$R_c = S_c / S_A \times 100$$

Medición del módulo de compresión

65 Una muestra cilíndrica que presentaba un diámetro de 8.5 mm y una altura de 15 mm se sumergió en una solución salina tamponada con fosfato (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 0.14 M, pH 7.4) a una temperatura de

25 °C y una humedad de 65% durante 30 minutos. El agua presente sobre la superficie de la muestra se secó después suavemente. Se aplicó una carga uniaxial a la muestra utilizando un probador universal de precisión (Autograph AGS-J, producido por Shimadzu Corporation, capacidad de celda de carga: 1 kN). Específicamente, después de ajustar una muestra de tal manera que el lado largo de la muestra fuera perpendicular a una platina inferior (material: acero inoxidable, diámetro interno: 100 mm, espesor: 25 mm), se hizo descender una platina superior (material: acero inoxidable, diámetro interno: 100 mm y espesor: 25 mm) a una velocidad de 10 mm/min. Cuando la muestra se deformó en un 80%, se detuvo el probador. El módulo de compresión se calculó a partir de la pendiente de la parte lineal inicial de la curva de tensión-deformación obtenida.

10 Medición de la porosidad

Para cada una de las muestras cilíndricas (con forma de comprimido) que presentan un diámetro de 8.5 mm y un espesor de 1.5 mm obtenidas en los ejemplos 1 a 3 y los ejemplos comparativos 1 a 4, la porosidad se midió de la manera siguiente.

Como pretratamiento, las muestras se secaron a una temperatura constante de 120 °C durante 4 horas. Para cada muestra después del pretratamiento se determinó la distribución de poros de poros que presentaban un diámetro de poro de 0.0036 a 200 µm en las condiciones siguientes mediante el procedimiento de intrusión de mercurio utilizando el dispositivo de medición siguiente.

Dispositivo de medición: AutoPore IV9520 (disponible de Micromeritics Japan)

Condiciones de medición:

Ángulo de contacto entre la muestra y el mercurio: 140°

Tensión superficial del mercurio: 0.48 N/m (convertida por 1 dina = 10⁻⁵ N)

La porosidad se determina mediante la fórmula siguiente utilizando el volumen total de poros y la densidad aparente medidos mediante el procedimiento de intrusión de mercurio:

$$\text{Porosidad (\%)} = \text{volumen de poros total} / \{ (1/\text{densidad aparente}) + \text{volumen de poros total} \} \times 100$$

La tabla 1 muestra los resultados de la medición de la dimensión fractal (D), proporción de partículas de OCP de 300 µm o más, proporción de partes de colágeno, porosidad y módulo de compresión.

ES 3 012 401 T3

Tabla 1

	Procedimiento de mezclado	Velocidad de agitación	Tiempo	Dimensión fractal	Proporción de partículas de 300 μm o más (%)	Proporción de partes de colágeno (%)	Porosidad (%)	Módulo de compresión (MPa)
Ejemplo comparativo 1	Agitador, 4 palas	100 rpm	15 segundos	0.78	96.3	11.6	95	0.064
Ejemplo 1	Agitador, 4 palas	300 rpm	60 segundos	0.80	93.1	2.6	97	0.107
Ejemplo 2	Agitador, 4 palas	300 rpm	300 segundos	1.19	88.8	0	96	0.105
Ejemplo comparativo 2	Agitador, 4 palas	300 rpm	900 segundos	0.56	88.2	0	97	0.045
Ejemplo comparativo 3	Mezclador rotatorio/giratorio	300 rpm	15 segundos	0.53	90.1	45.2	97	0.034
Ejemplo 3	Mezclador rotatorio/giratorio	1000 rpm	60 segundos	0.97	91.6	0	98	0.101
Ejemplo comparativo 4	Mezclador rotatorio/giratorio	2000 rpm	900 segundos	0.68	74.0	0	97	0.058

Los resultados de la tabla 1 muestran lo siguiente.

5 Todas las muestras (materiales compuestos porosos) obtenidas en los ejemplos 1 a 3 presentaban una dimensión fractal igual o superior a 0.70. La proporción de partículas de 300 µm o más fue de 75% o superior. La proporción de partes de colágeno fue de 3% o inferior. Las partículas de OCP se dispersaron uniformemente mientras se mantenía el tamaño de partícula predeterminado. Se logró un mezclado suficiente.

10 La muestra obtenida en el ejemplo comparativo 1 presentaba una dimensión fractal de 0.78. La proporción de partículas de 300 µm o más fue de 96%. Las partículas de OCP se dispersaron uniformemente mientras se mantenía el tamaño de partícula predeterminado. Sin embargo, debido a una agitación ligeramente insuficiente, la proporción de partes de colágeno fue de 11% y no se logró un mezclado suficiente.

15 La muestra obtenida en el ejemplo comparativo 2 era tal que la proporción de partículas de 300 µm o más era de 88% y no existía ninguna parte que consistiera únicamente en colágeno. Se logró un mezclado suficiente mientras se mantenía el tamaño de partícula predeterminado. Sorprendentemente, sin embargo, una agitación excesiva dio como resultado una presencia desproporcionada de partículas de OCP en la parte periférica del disco, y la muestra del ejemplo comparativo 2 presentaba una dimensión fractal baja igual o inferior a 0.56.

20 La muestra obtenida en el ejemplo comparativo 3 era tal que la proporción de partículas de 300 µm o más era de 90% y se mantuvo el tamaño de partícula predeterminado. Sin embargo, la dimensión fractal era de sólo 0.53 y las partes de colágeno representaban 45%, que es una proporción muy alta. Estos resultados sugieren que se produjo una agitación claramente insuficiente en tales condiciones de agitación.

25 La muestra obtenida en el ejemplo comparativo 4 presentaba una dimensión fractal de 0.68 y no existía ninguna parte que consistiera solamente en colágeno. Aunque se observó una dispersión uniforme de partículas de OCP y un mezclado suficiente, la proporción de las partículas de 300 µm o más fue de 74% y el mantenimiento del tamaño de partícula predeterminado fue complicado. Esto se debe presumiblemente a que las partículas de OCP se disgregaron mediante agitación vigorosa a largo plazo y la proporción de las partículas de 300 µm o más disminuyó.

30 Las muestras obtenidas en los ejemplos 1 a 3 presentaban un módulo de compresión de aproximadamente 0.1 MPa, que es de 1.6 a 3.1 veces más alto que el módulo de compresión de las muestras obtenidas en los ejemplos comparativos 1 a 4. Esto se debe presumiblemente a que en los ejemplos 1 a 3, las partículas de OCP estaban dispersadas uniformemente en todo el material compuesto y había sólo una pequeña parte en la que el OCP y el colágeno estaban insuficientemente mezclados y, por lo tanto, el OCP funcionaba eficazmente como reforzador.

35 Ensayo de implante de material compuesto poroso

40 Se utilizaron ratas SD macho (de 12 semanas de edad) como animales de ensayo. Las ratas se anestesiaron por vía intraperitoneal, y se realizaron incisiones en la piel y el periostio en la región de la bóveda craneal de cada rata para dejar al descubierto la bóveda craneal. Se creó en cada rata un defecto óseo normalizado de espesor completo (diámetro: aproximadamente 9 mm), para el que no se podía esperar una recuperación espontánea. Uno de los materiales compuestos porosos con forma de disco producidos en el ejemplo 1, el ejemplo 2, el ejemplo comparativo 3 y el ejemplo comparativo 4 se implantó en el defecto óseo de cada rata. Se utilizó una rata cada vez para el ensayo de implante de los materiales compuestos porosos producidos en los ejemplos 1 y 2 y el ejemplo comparativo 4, mientras que se utilizaron dos ratas en el ensayo de implante del material compuesto poroso producido en el ejemplo comparativo 3. Después de implantar cada muestra, se suturaron el periostio y la piel y se completó la cirugía. El periodo de observación después de la cirugía fue de 10 semanas para cada grupo.

50 Diez semanas después de la cirugía, las ratas se sacrificaron con una sobredosis de anestesia de pentobarbital. Se recogieron la bóveda craneal y los tejidos circundantes y se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% tamponado con fosfato 0.1 M (pH 7.4). Después de descalcificar la bóveda craneal y los tejidos circundantes con EDTA al 10% y de preparar muestras de parafina, se prepararon rodajas de tejido con un espesor de 6 µm mediante un corte en el plano frontal y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) para preparar muestras de tejido.

55 Las figuras 6 a 10 representan los resultados de cada grupo. En los ejemplos 1 y 2, se puede confirmar la dispersión uniforme de las partículas aglomeradas de OCP. En el espécimen en el que se implantó el material compuesto poroso del ejemplo 1 se observó hueso nuevo en muchas partes dentro de la región de defecto óseo y asimismo se observó que las otras partes estaban ocupadas por tejido conectivo asociado con la regeneración ósea. En la muestra en la que se implantó el material compuesto poroso del ejemplo 2, muchas partes dentro de la parte de defecto óseo completa estaban ocupadas por hueso nuevo. En particular, en la periferia del defecto, el límite entre la parte del defecto y el lecho óseo es borroso y se observa una regeneración ósea activa. En cualquiera de las muestras, a medida que progresa la regeneración ósea, el tamaño de las partículas aglomeradas de OCP se vuelve más pequeño. Además, asimismo se puede observar la migración de nuevo tejido óseo a las partículas aglomeradas de OCP. Los resultados sugieren que el OCP ejerce efectos mantenidos y actúa eficazmente durante

60

65 el periodo.

5 Por el contrario, en las dos muestras preparadas utilizando el material compuesto poroso del ejemplo comparativo 3, las partículas aglomeradas de OCP estaban distribuidas de manera desigual o apenas estaban presentes. En la muestra de tejido representada en la figura 8, se observa parcialmente hueso nuevo. Sin embargo, no se observa una nueva formación ósea a lo largo de todo el defecto óseo. Además, las partículas aglomeradas de OCP permanecieron casi iguales en tamaño, y tampoco se observó migración de nuevo tejido óseo a las partículas aglomeradas. En la muestra de tejido representada en la figura 9, se observa claramente que no hay presencia de hueso nuevo, y el material derivado del colágeno permanece sin degradar. Los resultados mostrados en las figuras 8 y 9 sugieren ambos que la regeneración ósea no era tan activa en el ejemplo comparativo 3. En la muestra en la que se implantó el material compuesto poroso del ejemplo comparativo 4, apenas había presencia de partículas aglomeradas de OCP, y se observó muy poca formación de hueso nuevo. Además, se observó que la estructura de esponja derivada del colágeno permanecía en la muestra. Estos resultados sugieren que la migración celular requerida para la regeneración ósea apenas progresó.

15 Aplicabilidad industrial

20 El material compuesto poroso de la presente invención y el material de regeneración ósea que comprende el material compuesto poroso presentan una alta capacidad de regeneración ósea y una resistencia mecánica apropiada. Por lo tanto, el material de regeneración ósea es útil principalmente para la reparación de defectos óseos en el sector de la cirugía oral dental y el sector de la cirugía ortopédica.

REIVINDICACIONES

1. Material compuesto poroso que comprende fosfato octacálcico y colágeno, caracterizado por que
- 5 en una imagen obtenida ampliando un intervalo de 5.0 mm × 5.0 mm de un plano del material compuesto poroso 15 veces con un microscopio electrónico de barrido (SEM),
- las partículas aglomeradas de fosfato octacálcico presentan una dimensión fractal (D) de 0.70 o más; y
- 10 el área de unas partes (c) que consisten en colágeno representa 5% o menos del área total de unas partes (a) que consisten en partículas aglomeradas de fosfato octacálcico, unas partes (b) que consisten en micropartículas de fosfato octacálcico y colágeno y las partes (c) que consisten en colágeno; y
- 15 el material compuesto es obtenible controlando el nivel de agitación dentro de un intervalo específico cuando se realiza una etapa de mezcla de fosfato octacálcico y colágeno en el proceso de producción de un material compuesto poroso que comprende el fosfato octacálcico y el colágeno amasando colágeno y fosfato octacálcico que utiliza un agitador con un impulsor y que realiza la agitación a 100 a 300 rpm durante 15 a 300 segundos o que utiliza un mezclador rotatorio y giratorio y que realiza la agitación a 500 a 1500 rpm durante 30 a 300 segundos.
- 20 2. Material compuesto poroso según la reivindicación 1, en el que el área de partículas aglomeradas de fosfato octacálcico que presentan una longitud de 300 μm o más representa 75% o más del área total de las partículas aglomeradas de fosfato octacálcico.
- 25 3. Material compuesto poroso según la reivindicación 1 o 2, en el que la dimensión fractal (D) es de 0.80 o más.
4. Material compuesto poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el área de las partes (c) que consisten en colágeno representa 4% o menos sobre la base del área total de la imagen de análisis.
- 30 5. Material compuesto poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el área de las partes (c) que consisten en colágeno representa 3% o menos sobre la base del área total de la imagen de análisis.
6. Material compuesto poroso según la reivindicación 2, en el que el área de partículas aglomeradas de fosfato octacálcico que presentan una longitud de 300 μm o más representa 85% o más.
- 35 7. Material compuesto poroso según la reivindicación 2, en el que la dimensión fractal (D) es de 0.80 o más y el área de partículas aglomeradas de fosfato octacálcico que presentan una longitud de 300 μm o más representa 90% o más.
- 40 8. Material compuesto poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la relación de mezcla de fosfato octacálcico con respecto a 1 parte en peso de colágeno es de 0.5 a 35 partes en peso.
9. Material compuesto poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la relación de mezcla de fosfato octacálcico con respecto a 1 parte en peso de colágeno es de 1 a 20 partes en peso.
- 45 10. Material compuesto poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la relación de mezcla de fosfato octacálcico con respecto a 1 parte en peso de colágeno es de 2 a 10 partes en peso.
11. Material compuesto poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el material compuesto poroso presenta un módulo de compresión de 0.08 MPa o más.
- 50 12. Material de regeneración ósea que comprende el material compuesto poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 55 13. Procedimiento para producir el material compuesto poroso según la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de amasar colágeno y fosfato octacálcico que utiliza un agitador con un impulsor y que realiza la agitación a 100 a 300 rpm durante 15 a 300 segundos o que utiliza un mezclador rotatorio y giratorio y que realiza la agitación a 500 a 1500 rpm durante 30 a 300 segundos.
- 60 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la etapa de amasar colágeno y fosfato octacálcico utiliza el agitador con un impulsor y la agitación se realiza a 100 a 300 rpm durante 30 a 120 segundos o un mezclador rotatorio y giratorio y la agitación se realiza a 500 a 1500 rpm durante 45 a 120 segundos.
- 65 15. Procedimiento según la reivindicación 13 o 14, en el que el agitador con impulsor se selecciona de entre agitadores de tipo hélice con 2 a 4 palas y agitadores de tipo paleta.

Fig. 1

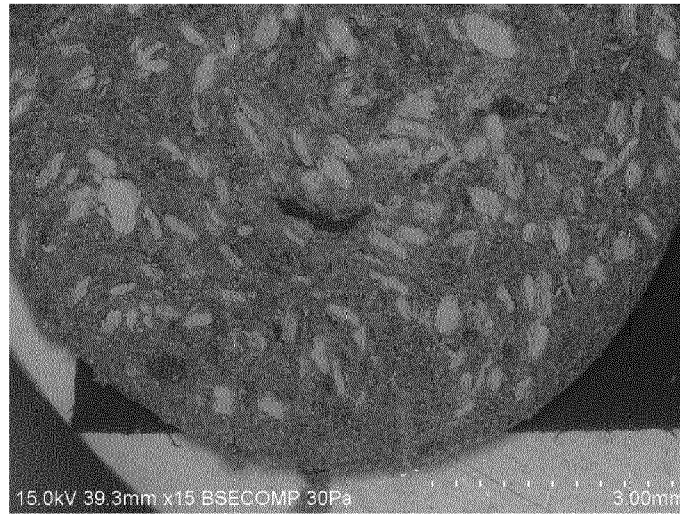


Fig. 2

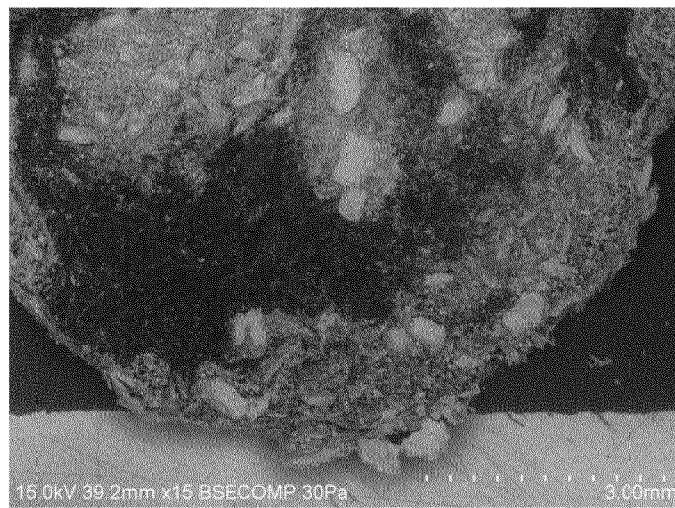


Fig. 3

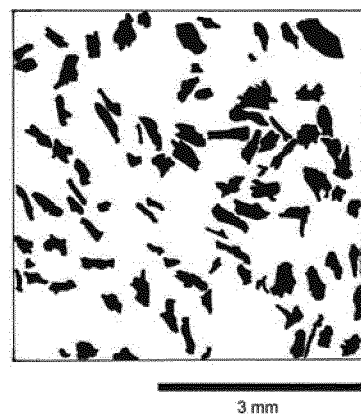


Fig. 4

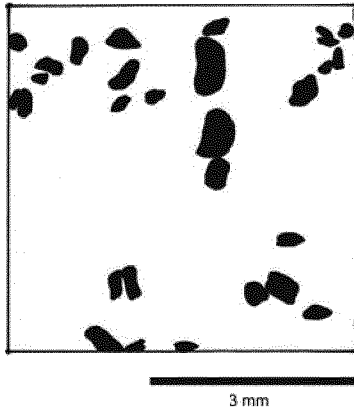


Fig. 5

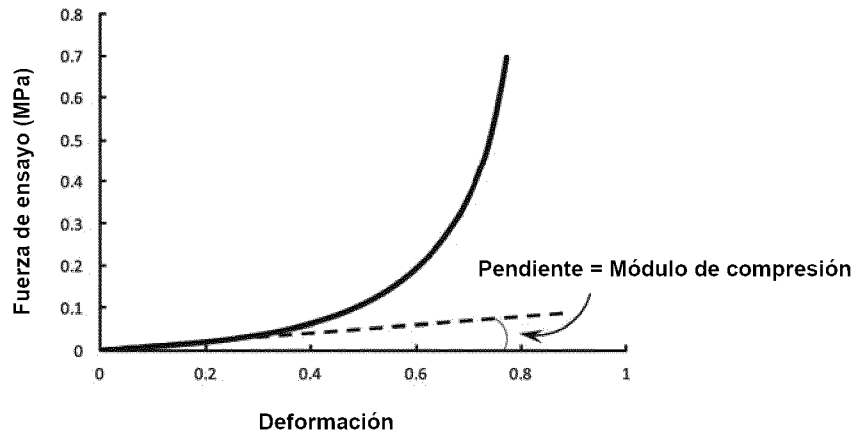


Fig. 6

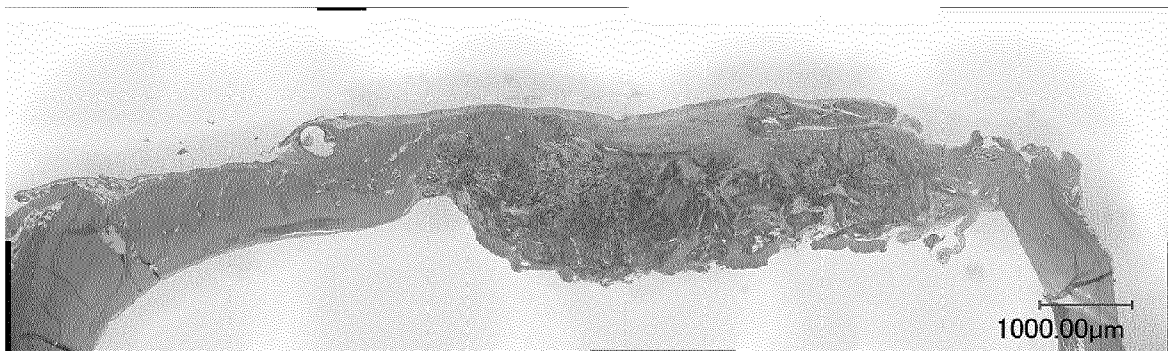


Fig. 7

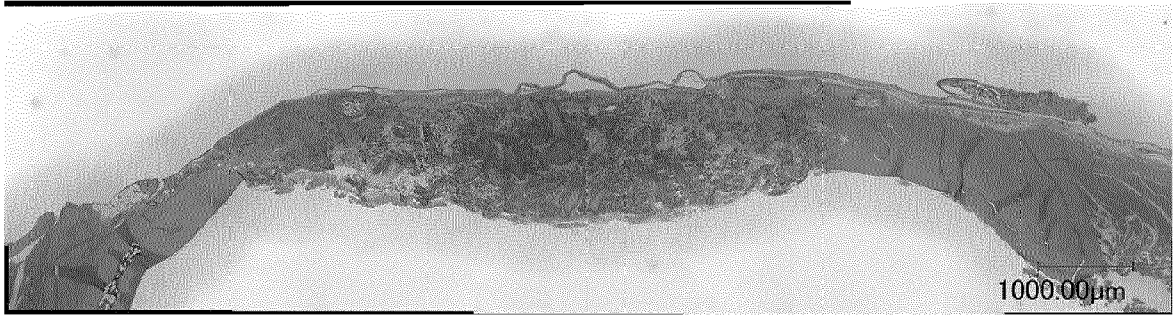


Fig. 8



Fig. 9

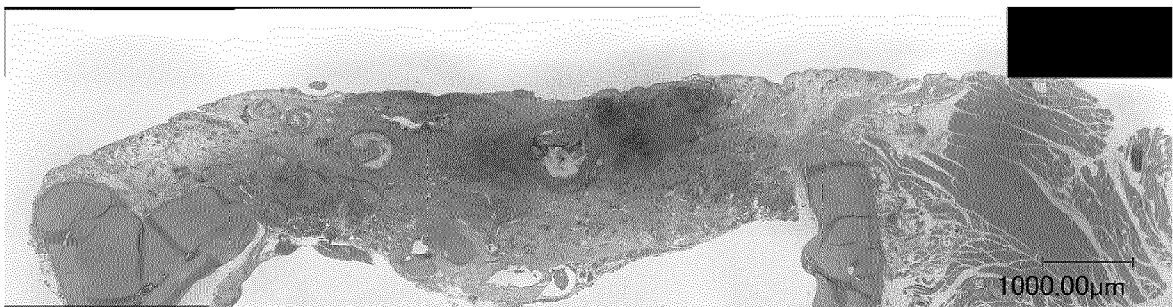


Fig. 10

