

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 574**

21 Número de solicitud: 202031200

51 Int. Cl.:

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.06.2022

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD CATÓLICA DE
VALENCIA SAN VICENTE MÁRTIR (100.0%)
C/ Quevedo, 2
46001 Valencia (Valencia) ES**

72 Inventor/es:

**SERRANO AROCA, Ángel;
SERRA AGUADO, Claudio Iván y
LLORENS GÁMEZ, Mar**

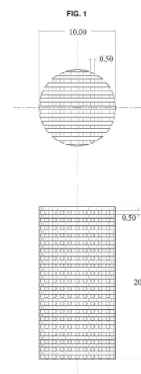
74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

54 Título: **ANDAMIO BIODEGRADABLE Y ANTIMICROBIANO PARA INGENIERÍA TISULAR ÓSEA Y
PROCEDIMIENTO PARA SU OBTENCIÓN**

57 Resumen:

La presente invención se engloba dentro de la producción de andamios, (scaffolds) biodegradables con aplicación en ingeniería tisular ósea en el tratamiento, regeneración y recuperación de defectos óseos. En concreto, la presente invención se refiere a un andamio biodegradable con estructura porosa con capacidad osteoinductora y propiedades mecánicas y de absorción de agua óptimas para su uso en ingeniería tisular ósea, que además presenta actividad antibacteriana para combatir infecciones en el lugar del defecto óseo a regenerar, incluidas aquellas causadas por patógenos multiresistentes a antibióticos. Dicho andamio comprende un cuerpo, soporte o estructura porosa con forma tridimensional (3D) constituido a partir de un material polimérico, y un hidrogel de alginato de calcio y zinc, caracterizado porque dicho hidrogel de alginato de calcio y zinc se encuentra integrado en la estructura anterior recubriendo o rellenando la estructura o cuerpo poroso de material polimérico y porque el hidrogel de alginato de calcio y zinc comprende entre 4% a 7% en peso de iones de zinc y 3% a 6% en peso de iones de calcio.



ES 2 913 574 A1

DESCRIPCIÓN

ANDAMIO BIODEGRADABLE Y ANTIMICROBIANO PARA INGENIERIA TISULAR OSEA Y
PROCEDIMIENTO PARA SU OBTENCIÓN

5 **Campo de la invención**

La presente invención se engloba dentro de la producción de andamios, (*scaffolds*) biodegradables con aplicación en ingeniería tisular ósea en el tratamiento, regeneración y recuperación de defectos óseos. En concreto, la presente invención se refiere a un
10 andamio biodegradable con estructura porosa con capacidad osteoinductora y propiedades mecánicas y de absorción de agua óptimas para su uso en ingeniería tisular ósea, que además presenta actividad antibacteriana para combatir infecciones en el lugar del defecto óseo a regenerar, incluidas aquellas causadas por patógenos multiresistentes a antibióticos. La presente invención comprende igualmente un proceso
15 para la obtención de dichos andamios con aplicación directa en ingeniería tisular ósea y el uso de estos andamios como componente de implantes, injertos y sustitutos de injerto óseo.

Antecedentes

20 Un defecto óseo es una pérdida de hueso en cualquier parte del cuerpo, donde en condiciones normales, tendría que estar presente [1]. Los defectos óseos pueden surgir a partir de anomalías congénitas como una hemimelia fibular [2], o anomalías adquiridas como fracturas, enfermedades (osteoporosis y osteosarcomas), cirugías (remoción quirúrgica tumoral) e infecciones [2-8]. Un defecto óseo es crítico cuando,
25 habiendo una biología adecuada, hay una incapacidad de reemplazar una pérdida ósea abundante y que, a pesar una estabilización adecuada, no osifica de manera espontánea [5,7,9,10-13]. Esto ocurre generalmente cuando el tamaño del defecto es mayor a 1-2 cm o cuando hay una pérdida de más del 50% de la circunferencia del hueso. Del mismo modo, las condiciones biomecánicas, la edad del paciente, el estado
30 metabólico y sistémico del mismo y las lesiones relacionadas que afectan a la osificación del defecto son otras condiciones que influyen en su determinación [7]. Hay que destacar que un defecto óseo crítico no puede osificar de manera adecuada sin la

ayuda terapéutica o con materiales diseñados para favorecer la regeneración ósea [5]. Teniendo en cuenta todos los factores enumerados anteriormente, el método de tratamiento no es universal, sino que se selecciona de manera individual para cada paciente. Antes de nada, es necesario conocer las condiciones que deben darse para

5 una correcta cicatrización ósea, para poder entender el por qué los defectos óseos críticos no siguen una cicatrización adecuada. La cicatrización de un hueso, también llamada osificación, se asemeja a la cicatrización de un tejido, con la fase inflamatoria, de proliferación y de remodelación. El hueso es un tejido que tiene capacidad de remodelación tanto a nivel funcional como estructural [5]. El objetivo de la osificación de

10 un hueso es alcanzar una capacidad funcional y una estructura histológica lo más parecida a la inicial. Es decir, regenerar el tejido mineralizado en el lugar de la lesión y también, restaurar la resistencia mecánica [14]. Existen dos tipos de osificaciones, la osificación primaria o directa y la osificación secundaria o indirecta. Por una parte, en la osificación primaria se forma hueso directamente en el foco de fractura. Para ello, los

15 dos requisitos que se deben dar son: tener un máximo de 1 mm entre los fragmentos óseos y menos de un 2% de micromovimientos en el foco de fractura [15]. Por otra parte, la osificación secundaria o indirecta, se caracteriza por la formación de tejido conjuntivo denominado callo, que evoluciona de un tejido fibroso a cartilaginoso, para finalmente generar el tejido óseo en el foco de fractura. A este último estado, le

20 continúa una fase de remodelación que puede continuar durante años hasta lograr la estructura y resistencia original del hueso [5-7,10,14,15]. Por estos motivos, se considera que los defectos óseos críticos no siguen una osificación primaria, sino una osificación secundaria; pero que requieren un apoyo externo, ya que ellos por si mismos no pueden resolverlo [5].

25 Por consiguiente, existen diversos métodos terapéuticos para tratar los defectos óseos críticos. A tal fin existen métodos terapéuticos naturales y sintéticos. Por un lado, dentro de los métodos terapéuticos naturales, se encuentran: autoinjertos (trasplantes de hueso desde una zona donante del mismo individuo, pero alejada de la región patológica, para reconstruir un defecto dentro del mismo paciente [2,16]); aloinjertos

30 (injertos de cadáveres o donantes vivos de la misma especie, pero genéticamente diferentes[16,17]) y xenoinjertos (son injertos de origen natural, pero proceden de otra especie como la especie bovina o derivados del coral [14,17-19]). Dentro de los autoinjertos, se encuentran de hueso esponjoso y de hueso cortical. Los autoinjertos

esponjosos tienen las propiedades osteogénicas y osteoinductoras deseadas [2,6,10,11,16-18] y los autoinjertos corticales son mayoritariamente injertos osteoconductores con muy poca capacidad de osteoinducción pero facilitan un gran soporte mecánico [18,19]. Por estos motivos, los autoinjertos corticales son los óptimos
5 para defectos óseos críticos ya que requieren un elevado soporte mecánico estructural [18]. Por otra parte, en contraposición a los métodos terapéuticos naturales, se encuentran los sintéticos para solucionar defectos óseos críticos. Dentro de éstos podemos diferenciar los implantes o prótesis y los *scaffolds*. En primer lugar, los implantes o prótesis sustituyen la presencia de material natural en el defecto óseo, pero
10 no pretenden que el organismo aproveche el implante para poder osificar. Dentro de los implantes tradicionales, los materiales clásicos que se han empleado son: acero inoxidable, aleación de cromo y cobalto, titanio o aleación de titanio. Pero estos materiales no pueden replicar mecánicamente el hueso, lo que puede derivar en que no se integren de manera adecuada en el receptor [4,10,16]. Por este motivo, ha habido
15 una evolución de estos implantes que sustituyen tejido por biomateriales sintéticos que se integran en el mismo. Actualmente, las opciones principales para tratamientos regenerativos de defectos óseos son tratamientos autólogos, alogénicos o implantes sintéticos, pero ninguna de estas técnicas ha demostrado ser completamente satisfactoria [2,8,16]. Estas limitaciones han llevado a los científicos y clínicos a centrar
20 su investigación en aspectos de ingeniería tisular y medicina regenerativa como la reconstrucción ósea y en el desarrollo de soportes, andamios y/o matrices también denominados "*scaffolds*" para favorecer la regeneración ósea [2,3,6,8]. Estos *scaffolds* están compuestos por biomateriales y se pueden utilizar para el tratamiento de defectos óseos. Para llevar a cabo esto, deben cumplir las siguientes funciones específicas:
25 actuar como sustrato celular, suministrar una nutrición, administrar moléculas bioactivas y proporcionar estímulos para dirigir a las células a su destino [6]. Para realizar dichas funciones, estos *scaffolds* deben tener las características ideales de ser osteogénicos, biocompatibles, biodegradables, capaces de proporcionar soporte estructural, fáciles de implantar y rentables [1,6]. Los materiales con los que se fabrican los *scaffolds* son
30 bioactivos y reabsorbibles en el tiempo. Se degradan gradualmente y son reemplazados por tejidos del huésped, lo que facilita la reparación *in situ*. Para esto, los ingenieros deben inspirarse en la composición y estructura natural del hueso [16]. Estos biomateriales no deben ser mutagénicos, antigénicos, cancerígenos o teratogénicos, ni

tóxicos, además deben permitir la osteointegración sin provocar una reacción inmunológica adversa [4,6].

Se pueden elegir varios biomateriales según el objetivo (resistencia mecánica o relleno) y el enfoque (percutáneo o quirúrgico) que se seleccionan de entre polímeros, cerámicas o mezclas de los mismos. Además, algunos biomateriales están compuestos por factores de crecimiento como las proteínas morfogénicas óseas (BMP) para inducir la reparación ósea [16]. Idealmente, los biomateriales deben ser absorbibles a una velocidad variable dependiendo de su función biomecánica anticipada y deben permitir el crecimiento de vasos sanguíneos recién formados de los tejidos vecinos, siendo la vascularización de buena calidad del tejido en contacto con el *scaffold* un aspecto crucial [10,16].

Igualmente, estos *scaffolds* pueden fabricarse de manera precisa, reproduciendo las características anatómicas del hueso nativo, manteniéndose la integridad estructural suficiente durante el proceso de crecimiento y remodelación *in vitro* y/o *in vivo* [8]. Del mismo modo, la construcción adecuada de un *scaffold* debe poseer una red tridimensional altamente porosa, con poros interconectados y con propiedades de superficie, que estén optimizadas para la unión, migración, proliferación y diferenciación de los tipos de células de interés y que permitan el transporte de nutrientes y desechos metabólicos. Además, deben poseer una tasa de biocompatibilidad y biodegradabilidad definida para complementar el crecimiento tisular [8].

No menos importante a los requisitos anteriores es el hecho de que la implantación del *scaffold* en la zona dónde se debe regenerar el hueso requiere necesariamente cirugía, la cual, según se conoce puede comprometerse por la fácil aparición de infecciones bacterianas. Se conoce que al menos el 10% de estas intervenciones están asociadas a la aparición de infecciones bacterianas, que comprometen la eficacia y utilidad del *scaffold* a los fines deseados.

Las infecciones asociadas a dispositivos implantables están caracterizadas por la adhesión bacteriana, colonización y desarrollo de un *biofilm*. Los organismos más comunes asociados a las infecciones en dispositivos implantables incluyen, las cepas Gram-positivas: *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, and

Propionibacterium acnes, así como las cepas Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*. La osteomielitis es la inflamación del hueso y puede aparecer como consecuencia de la formación del biofilm, causando un incremento sustancial de la resorción del hueso y formación de hueso reactivo.

- 5 El biofilm está compuesto por sustancias secretadas por las bacterias, tales como, proteínas, lípidos, lipopolisacáridos y DNA formando una matriz alrededor de la bacteria que le proporciona protección frente a la acción del antibiótico y las defensas inmunes. Las bacterias presentes en el biofilm tienen además una tasa de mutación superior pudiendo presentar una mayor virulencia cuando se exponen a los antibióticos y
10 favoreciendo la generación de fenotipos resistentes a los antibióticos.

Sin embargo, las medidas que actualmente se contemplan para tratar de evitar la aparición de infecciones asociadas al uso de *scaffolds* no son del todo satisfactorias. De una parte, éstas se limitan a la administración de altas dosis de antibióticos junto con la implantación del scaffold en la zona afectada o directamente integrar la dosis de
15 antibiótico en el mismo scaffold. La administración de estas altas dosis de antibiótico supone un considerable aumento de las posibilidades de efectos secundarios provocados por el antibiótico, tales como reacciones alérgicas, así como en general la toxicidad del scaffold. Alternativamente se describe la incorporación de distintos iones en las matrices y estructuras que componen el scaffold, sin embargo, estas medidas
20 pueden resultar también tóxicas o la liberación de iones (osteoinductores y antimicrobianos) no se produce a la velocidad adecuada para conseguir al mismo tiempo inducir regeneración y prevenir infecciones

La patente ES2393602 describe materiales mesoporosos ordenados de sílice que incluyen entre sus poros tres antibióticos distintos: linezolid, rifampicina y vancomicina.

- 25 La patente española ES2405774 describe un andamio en base a uno o más polisacáridos y un agente reticulante que comprende antimicrobianos seleccionados de entre: alquilparabenos, tales como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno, cresol, clorocresol, hidroquinona, benzoato de sodio, benzoato de potasio, triclosano, clorhexidina, rifampicina, minociclina, clorhexidina, agentes de iones
30 de plata y composiciones con una base de plata.

La patente japonesa JP5882997 describe un injerto óseo que comprende un componente inorgánico sólido y un hidrogel que contiene iones de silicio.

Opcionalmente puede contener otros iones, por ejemplo, estroncio, magnesio, potasio, cobre cobalto, níquel, cinc, selenio, plata y flúor.

5 La presente invención propone una solución a los problemas técnicos identificados anteriormente a través de la definición de un andamio, (*scaffold*) con aplicación en ingeniería tisular ósea para el tratamiento y recuperación de defectos óseos, incluidos los críticos, con capacidad osteoinductora que además previene infecciones, incluidas aquellas causadas por bacterias multiresistentes a antibióticos. Es decir, la presente invención propone una solución técnica efectiva a una necesidad existente en el campo
10 técnico de la ingeniería tisular ósea, proporcionando un andamio capaz de regenerar un defecto óseo, incluido un defecto óseo crítico, y tratando al mismo tiempo cualquier infección patógena, incluidas las infecciones multiresistentes que pudieran comprometer el proceso de regeneración ósea en el lugar del defecto óseo a tratar.

Descripción de la invención

15 La presente invención se refiere a un andamio, (*scaffold*) biodegradable con aplicación en ingeniería tisular ósea para el tratamiento, regeneración y recuperación de defectos óseos en mamíferos, así como un método para la obtención de dichos dispositivos médicos.

20 El andamio con aplicación en ingeniería tisular ósea de acuerdo con la presente invención se presenta en forma de estructura tridimensional (3D), porosa, biodegradable y biocompatible y presenta una resistencia mecánica a la compresión adecuada al lugar del implante. La estructura que conforma el andamio permite el desarrollo del nuevo tejido óseo en el defecto óseo a recuperar. De forma ventajosa, la
25 estructura y componentes que conforman el andamio presentan una acción osteoinductora y a la vez antibacteriana durante el proceso de regeneración ósea, resultando altamente efectivo a los fines deseados.

Es por ello un objeto de la presente invención, un andamio para su utilización en
30 ingeniería tisular ósea que comprende:

- un cuerpo, soporte o estructura porosa con forma tridimensional (3D) constituido a partir de un material polimérico, y
- un hidrogel de alginato de calcio y zinc,

caracterizado porque dicho hidrogel de alginato de calcio y zinc se encuentra integrado en el cuerpo, soporte o estructura porosa, y porque el hidrogel de alginato de calcio y zinc comprende entre 4% a 7% en peso de iones de zinc y 3% a 6% en peso de iones de calcio.

5

Es también un objeto de la presente invención un andamio de acuerdo con el párrafo anterior, caracterizado por que el hidrogel de alginato de calcio y zinc integrado en el cuerpo, soporte o estructura porosa se dispone a modo de recubrimiento o relleno de la estructura o cuerpo poroso de material polimérico.

10

Es también un objeto de la presente invención un andamio de acuerdo con los párrafos anteriores, caracterizado por que el cuerpo, soporte o estructura porosa con forma tridimensional (3D) está constituida a partir de un material polimérico seleccionado del grupo que comprende: poliésteres alifáticos, poli(aminoácidos), copoli(éter-ésteres),
 15 oxalatos de polialquilenos, poliamidas, policarbonatos derivados de tirosina, poli(iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amino, poli(anhídridos), polifosfacenos, biomoléculas, tales como colágeno, elastina, ácido hialurónico, almidones bioabsorbibles, y mezclas de los mismos, poliésteres alifáticos, tales como, homopolímeros y copolímeros de lactida,
 20 incluyendo ácido láctico, D-, L- y mesolactida, glicólido, incluyendo ácido glicólico), \varepsilon-caprolactona, p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona), carbonato de trimetileno (1,3-dioxan-2-ona), derivados de alquilo de carbonato de trimetileno, \delta-valerolactona, \beta-butirolactona, \gamma-butirolactona, \varepsilon-decalactona, hidroxibutirato (unidades de repetición), hidroxivalerato (unidades de repetición), 1,4-dioxepan-2-ona,
 25 incluyendo su dímero 1,5,8,12-tetraoxaciclotetradecan-7,14-diona, 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-1,4-dioxan-2-ona, 2,5-dicetomorfolina, pivalolactona, alfa, alfa-dietilpropiolactona, carbonato de etileno, oxalato de etileno, 3-metil-1,4-dioxan-2,5-diona, 3,3-dietil-1,4-dioxan-2,5-diona, 6,8-dioxabicyclooctan-7-ona y mezclas de polímeros de los mismos.

30

Es también un objeto de la presente invención un andamio de acuerdo con los párrafos anteriores, caracterizado por que el cuerpo, soporte o estructura porosa con forma tridimensional (3D) está constituido a partir de ácido poli-láctico (PLA).

Es también un objeto de la presente invención un andamio de acuerdo con los párrafos anteriores, caracterizado por que el recubrimiento de alginato de calcio y zinc comprende entre el 1,5 – 2% p/p (respecto al peso total del andamio)

- 5 Es también un objeto de la presente invención un andamio de acuerdo con los párrafos anteriores, caracterizado por que el volumen de poros es de 20 a 30% con un tamaño medio de poro de 400 a 600 μm .

Es también un objeto de la presente invención un andamio de acuerdo con los párrafos anteriores, caracterizado por que incorpora opcionalmente componentes seleccionados del grupo que comprende: grafeno, óxido de grafeno, nanofibras de carbono , grafito, óxido de grafeno reducido, grafeno reducido, nanotubos de carbono de pared simple o múltiple, fullereno, óxido de grafeno funcionalizado con alquilamina o con amoniaco, grafeno dopado con boro, grafeno dopado con nitrógeno, grafeno dopado con fósforo, grafeno dopado con azufre, grafeno dopado con boro y nitrógeno, grafeno dopado con fósforo y nitrógeno, grafeno dopado con azufre y nitrógeno y óxido de grafeno reducido sulfonado, nanocompuestos con nanomateriales de carbono como el grafeno/TiO₂, grafeno/Fe₃O₄, grafeno/Mn₃O₄, grafeno/Pd, grafeno/Pt, grafeno/PtCo, grafeno/PtPd, grafeno reducido/TiO₂, grafeno reducido/Fe₃O₄, grafeno reducido/Mn₃O₄, grafeno reducido/Pd, grafeno reducido/Pt, grafeno reducido/PtCo y grafeno reducido/PtPd y nanopartículas de polipirrol, nanopartículas y/o nanofibras como las nanopartículas de plata, oro, nanocelulosa, nanoarcillas ocerámicas.

Es también un objeto de la presente invención un proceso para la obtención de un andamio de acuerdo con los párrafos anteriores, que comprende las siguientes etapas:

25 a) Impresión 3D de un soporte, estructura o cuerpo poroso polimérico (1);
b) Inmersión a vacío de la estructura en una disolución acuosa de alginato de sodio (2,3);
c) Sonicación (4);
30 d) Inmersión de la estructura de polímero + alginato sódico en una disolución acuosa de cloruro cálcico (5,6);
e) Inmersión de la estructura de polímero +alginato cálcico en una disolución acuosa de cloruro de zinc (7,8)

- f) Purificación o lavado del andamio (10); y
- g) Secado en horno (9).

Es también un objeto de la presente invención un proceso de acuerdo con el párrafo anterior, caracterizado por que la impresión 3D del soporte, estructura o cuerpo poroso se lleva a cabo con la técnica de modelado por deposición fundida.

Es también un objeto de la presente invención un proceso de acuerdo con los párrafos anteriores, caracterizado por que la inmersión a vacío de la estructura en la etapa b) se realiza en una disolución acuosa de alginato de sodio a una concentración de 2% p/v.

Es también un objeto de la presente invención un proceso de acuerdo con los párrafos anteriores, caracterizado por que la inmersión de la estructura en la etapa c) se realiza en una disolución acuosa de cloruro de calcio a una concentración de 0.5% p/v y la inmersión de la estructura en la etapa d) se realiza en una disolución acuosa de cloruro de zinc a una concentración de 0.5% p/v.

Es también un objeto de la presente invención un andamio según definido en los párrafos anteriores para su uso en procesos reconstructivos de defectos óseos tales como: defectos segmentarios, defectos producidos por trauma, tumores osteolíticos, heridas de arma de fuego, defectos causados por osteoartrosis, cirugía, osteomielitis, cirugía tumoral, defectos óseos estructurales, defectos causados por osteoporosis, osteopenia y/o enfermedad ósea metabólica.

Es finalmente un objeto de la presente invención un implante, injerto y sustituto de injerto óseo que comprende un andamio según definido en los párrafos anteriores y en general en la presente invención.

Figuras

30

La Figura 1 representa la vista inferior y en alzada de un andamio de la invención.

La Figura 2 representa un esquema del proceso de fabricación del andamio de la invención.

5 La Figura 3 ilustra un andamio de PLA de 10 mm de sección transversal asociado a la placa de osteosíntesis por medio de ambos tornillos en vista caudal (A) y en vista lateral (B).

10 La Figura 4 ilustra el procedimiento quirúrgico en el modelo animal. Abordaje craneolateral al fémur de modo convencional (A), separación del vasto lateral de la superficie del fémur para exponer la diáfisis femoral (B), señalización del hueso con la sierra de corte posicionando en un lateral la placa con el andamio para seccionar la longitud exacta que tiene el andamio (C), sujeción de la placa con pinzas de reducción para evitar su movimiento (D), realización de orificio con la guía para brocas hasta taladrar las dos corticales del hueso (E), fijación del implante al fémur (F).

15 La Figura 5 representa los resultados del grado de osificación del defecto óseo siguiendo la escala descrita por Stacy y cols. [20]

La Figura 6 ilustra la reconstrucción 3D de las tomografías femorales. Fémur correspondiente al grupo UCV-1 (A) y fémur correspondiente al grupo UCV-0 (B).

20 La Figura 7 ilustra los resultados del ensayo antibacteriano de difusión en agar frente a la bacteria Gram-positiva MRSA y frente a la Gram-negativa *P. aeruginosa*.

La Figura 8 representa el espectro FTIR en la región de 4000-650 cm⁻¹. Andamios de PLA (a) y PLA con relleno alginato entrecruzado con cationes de calcio y zinc (b). El andamio de PLA con relleno de alginato entrecruzado muestra la incorporación de grupos OH típicos de hidrogeles con pico ancho entre 4000 y 3500 cm⁻¹.

25 La Figura 9 (a, b) muestran dos imágenes de secciones histológicas H-E a 4X, de zona de transición hueso-andamio, (ejemplo 2).

Descripción detallada de la invención

Como resultado de un intenso proceso de investigación, los inventores de la presente invención han logrado diseñar un andamio, (*scaffold*) biodegradable y poroso para su utilización en ingeniería tisular ósea que comprende:

- 5 - un cuerpo o estructura porosa con forma tridimensional (3D) constituido a partir de un material polimérico, y
- un hidrogel de alginato de calcio y zinc, caracterizado porque dicho hidrogel de alginato de calcio y zinc se encuentra recubriendo o rellenando la estructura o cuerpo poroso de material polimérico.

10 Material polimérico de la estructura 3D

Los materiales con los que se fabrican los andamios (*scaffolds*) de la presente invención son bioactivos y reabsorbibles en el tiempo. Se degradan gradualmente y son reemplazados por tejidos del huésped, lo que facilita la reparación del defecto óseo *in situ*. Los materiales que conforman el cuerpo o estructura porosa del andamio según la

15 presente invención son biomateriales no mutagénicos, antigénicos, cancerígenos o teratogénicos, ni tóxicos que además permiten la osteointegración sin provocar una reacción inmunológica adversa.

Los ejemplos de polímeros biocompatibles bioabsorbibles adecuados que podrían ser usados incluyen polímeros seleccionados del grupo constituido por poliésteres

20 alifáticos, poli(aminoácidos), copoli(éter-ésteres), oxalatos de polialquilenos, poliamidas, policarbonatos derivados de tirosina, poli(iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amino, poli(anhídridos), polifosfacenos, biomoléculas (es decir, biopolímeros tales como colágeno, elastina, ácido hialurónico, almidones bioabsorbibles, etc.) y mezclas de los

25 mismos. Para el objeto de la invención, los poliésteres alifáticos incluyen, pero no se limitan a, homopolímeros y copolímeros de lactida (que incluye ácido láctico, D-, L- y mesolactida), glicólido (incluyendo ácido glicólico), \varepsilon-caprolactona, p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona), carbonato de trimetileno (1,3-dioxan-2-ona), derivados de alquilo de carbonato de trimetileno, \delta-valerolactona, \beta-butirolactona,

30 \gamma-butirolactona, \varepsilon-decalactona, hidroxibutirato (unidades de repetición), hidroxivalerato (unidades de repetición), 1,4-dioxepan-2-ona (incluyendo su dímero 1,5,8,12-tetraoxaciclotetradecan-7,14-diona), 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-1,4-dioxan-2-ona, 2,5-dicetomorfolina, pivalolactona, alfa, alfa-dietilpropiolactona, carbonato

de etileno, oxalato de etileno, 3-metil-1,4-dioxan-2,5-diona, 3,3-dietil-1,4-dioxan-2,5-diona, 6,8-dioxabicycloctan-7-ona y mezclas de polímeros de los mismos.

De forma preferente se contempla la utilización de ácido poli-láctico (PLA) como único polímero para formar la estructura, cuerpo o soporte poroso del andamio de la presente
5 invención. En este caso se prefiere la utilización de filamento comercial de PLA para impresión 3D de la casa BQ (Madrid, España) para la técnica de modelado por deposición fundida (FDM) comercializada en bovinas con filamento de 1.75 mm y 1 Kg de peso. Preferentemente, la estructura porosa está constituida por PLA con una
10 relación $1,44 \pm 0,01$ (% en peso de carbón/% en peso de oxígeno) determinado por análisis elemental con el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Modelo Zeiss Ultra 55) a un voltaje de 20KV, por ejemplo. Adicionalmente también se contempla la utilización de otros polímeros, como son el policarbonato o el polivinil alcohol para la formación de la estructura o cuerpo poroso.

15 Hidrogel de alginato

El ácido algínico y sus sales son biopolímeros polielectrolitos. Está formado por dos tipos de unidades monoméricas: el ácido beta-D-manurónico y el ácido alfa-L-gulurónico. Típicamente, el ácido algínico está conformado como polímero en bloques, con secciones de unidades manurónicas alternadas con secciones de unidades
20 gulurónicas. El alginato en forma de sal sódica, potásica o magnésica es soluble en agua a pH mayores de 3.5. Por el contrario, al ácido algínico entrecruzado con cationes divalentes como el calcio o zinc son insolubles en agua. La presencia de pequeñas cantidades de cationes divalentes inhibe la hidratación de los alginatos y proporciones elevadas de los mismos causan su precipitación. A los efectos de la presente invención,
25 el andamio comprende un cuerpo o estructura porosa con forma tridimensional (3D) constituido a partir de un material polimérico que se halla recubierto o relleno con un hidrogel de alginato entrecruzado con iones de calcio y zinc.

Tal y como se detallará más adelante, el alginato entrecruzado con iones de calcio y zinc se obtiene una vez el cuerpo o estructura porosa ha sido recubierto con alginato
30 sódico y éste se entrecruza. El entrecruzamiento de dicho alginato sódico se produce cuando la estructura recubierta con alginato de sodio se pone en contacto con una disolución de cloruro cálcico y seguidamente con una disolución de cloruro de zinc, produciéndose el reemplazo de los iones de sodio por iones de calcio y zinc.

De esta forma, el alginato entrecruzado con calcio y zinc que forma parte del andamio adquiere su consistencia sólida así como la estabilidad deseada del andamio.

Por ello el alginato de sodio seleccionado para la presente invención tiene un peso molecular medio de 107.9 ± 2.7 KDa, y está constituido con bloques galurónicos y manurónicos pero con la cantidad adecuada de grupos galurónicos (FG = 0,436 en tanto por 1) que son los que se entrecruzan para poder formar un gel consistente físicamente pero sin tener excesivos puntos de entrecruzamiento que pudieran retener demasiado zinc y por tanto se pudiera dar toxicidad en el producto final.

10 A los efectos de la presente invención es también esencial que la carga de cationes calcio y zinc en el alginato entrecruzado que forma parte del andamio guarde unas proporciones determinadas, ya que dicho equilibrio resulta ser la clave de la presente invención en cuanto a proporcionar consistencia física al relleno de alginato y mediante los cationes de zinc la biofuncionalidad (antimicrobiano e inductor de regeneración) en
15 la cantidad óptima para no producir toxicidad. De acuerdo con la correspondiente medición realiza mediante análisis elemental en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Modelo Zeiss Ultra 55) a un voltaje de 20KV, se ha calculado que zinc está presente en el alginato en el rango de 4% a 7% en peso, preferentemente, 6,52% y 6,6 % en peso y la presencia de iones de calcio en el rango de 3% a 6% en
20 peso, de forma preferente, 4.07 y 4.23 % en peso. (El % en peso de zinc y calcio indicado corresponde al porcentaje en peso de los átomos respecto al resto de átomos presentes, esto es, C, H, O, Zn y Ca). De forma preferente, se considera que la relación de carga óptima de ambos iones en el alginato es de $1,58 \pm 0,02$ (%en peso de zinc/%en peso de calcio).

25

En cuanto a la disposición del alginato de calcio y zinc en el cuerpo, estructura o soporte poroso de material polimérico, el alginato entrecruzado con calcio y zinc se encuentra recubriendo dicho soporte y/o rellenando parcialmente las oquedades porosas del cuerpo, estructura o soporte. Es decir, la incorporación del alginato
30 entrecruzado en la estructura mantiene la estructura porosa del andamio, con un alto grado de interconectividad de poros, necesario para que pueda ejercer su capacidad osteoinductora. Es decir, la porosidad abierta e interconectada del andamio facilita la

colonización por parte de las células, la difusión de los nutrientes esenciales y oxígeno para la supervivencia celular y productos de desecho.

En una realización de la presente invención un andamio cuya estructura porosa es de
 5 PLA tiene un recubrimiento de alginato de calcio/zinc comprendido ente el 1.5 y el 2% peso/peso determinado graviméricamente.

Tal y como se muestra en la Figura 1, el soporte poroso que compone el andamio de la presente invención tiene una estructura homogénea de poros, con un volumen de poros
 10 de 20% a 30% y con un tamaño medio de entre 400 a 600 μm , de forma preferente, 500 μm .

En una realización de la presente invención un andamio cuya estructura porosa es de PLA tiene una porosidad del $26,6\% \pm 0,05$ en volumen. Cuando se rellena con el recubrimiento de alginato de calcio/zinc esta porosidad disminuye ligeramente a
 15 $26,1\% \pm 0,05$. Estas porosidades fueron determinadas graviméricamente mediante relleno de poros con agua destilada y a partir de las medidas de densidad del alginato de calcio/zinc determinado en forma de film utilizando el mismo alginato de sodio y la misma cantidad de entrecruzador de cloruro de calcio y cloruro de zinc determinado en una balanza de precisión con accesorio para densidad mediante medida de la masa de
 20 la muestra en el aire e inmersa en n-octano a 25°C . La densidad (n=6) fue: $2.022 \pm 0.012 \text{ g/cm}^3$

A partir de la absorción de agua por gravimetría y la densidad medida del alginato de calcio/zinc se calculó la porosidad de los scaffolds con y sin recubrimiento de alginato de calcio/zinc.

Muestra	Porosidad
Scaffold PLA	26.60 ± 0.05
Scaffold PLA-Alginato calcio/zinc	26.15 ± 0.05

25

Otros componentes opcionales

El andamio de acuerdo con la presente invención contempla la incorporación adicional de otros componentes, si bien, estos componentes no son necesarios para que el andamio ejerza su acción osteoinductora y antibacteriana. Estos componentes pueden
 30 mejorar y facilitar las acciones deseadas en el andamio y pueden ser seleccionados de

entre: nanomateriales que aumentan la conductividad eléctrica del andamio, tales como los nanomateriales de carbono conductores (grafeno, óxido de grafeno, nanofibras de carbono , grafito, óxido de grafeno reducido, grafeno reducido, nanotubos de carbono de pared simple o múltiple, fullereno, óxido de grafeno funcionalizado con alquilamina o con amoníaco, grafeno dopado con boro, grafeno dopado con nitrógeno, grafeno dopado con fósforo, grafeno dopado con azufre, grafeno dopado con boro y nitrógeno, grafeno dopado con fósforo y nitrógeno, grafeno dopado con azufre y nitrógeno y óxido de grafeno reducido sulfonado), nanocompuestos con nanomateriales de carbono como el grafeno/TiO₂, grafeno/Fe₃O₄, grafeno/Mn₃O₄, grafeno/Pd, grafeno/Pt, grafeno/PtCo, grafeno/PtPd, grafeno reducido/TiO₂, grafeno reducido/Fe₃O₄, grafeno reducido/Mn₃O₄, grafeno reducido/Pd, grafeno reducido/Pt, grafeno reducido/PtCo y grafeno reducido/PtPd)) y nanopartículas de polipirrol, nanopartículas y/o nanofibras como las nanopartículas de plata, oro, nanocelulosa, nanoarcillas, cerámicas, etc. La incorporación de estos componentes se realiza a través del relleno de alginato.

Una de las ventajas más apreciables de los andamios definidos en la presente invención es que la incorporación de zinc en el andamio a través del alginato proporciona una función osteoinductora además de antibacteriana, lo cual permite no tener que incorporar necesariamente en la estructura del andamio factores de crecimiento como factores osteogénicos, tal como la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2), que puede generar problemas asociados con la inmunogenicidad, riesgo de cáncer y alteraciones en la homeostasis celular. Además de todo ello resulta un ahorro en costes y facilidad del procedimiento de fabricación de los andamios.

Una ventaja adicional del andamio definido en la presente invención es que no requiere la incorporación de células para promover la formación ósea, por lo que también resulta en un ahorro en costes y facilidad del procedimiento de fabricación del mismo.

Método de fabricación del andamio

Para la fabricación del cuerpo o estructura porosa con forma tridimensional del andamio se contemplan distintos métodos y técnicas, entre los cuales se incluyen: espumado con gas, técnicas de inyección en molde desde el fundido, extrusión, electrospinning o electrohilado y preferentemente, técnicas de prototipado rápido. Estas técnicas de

prototipado rápido comprenden la fabricación de las estructuras capa por capa en un proceso controlado a través de un determinado software que define el diseño previamente. Entre las tecnologías de prototipado rápido se encuentran: modelado por deposición de material fundido (*FDM*), estereolitografía (*SLA*), impresión por
5 bioextrusión 3D (*3D-P*), fabricación por corte y laminado (*LOM*) y fotopolimerización por luz UV (*SGC*).

De forma preferente, la presente invención contempla la utilización de la técnica por deposición fundida (*FDM*). Esta técnica está basada en la deposición sobre una plataforma de capas de material fundido proveniente del calentamiento y ablandamiento
10 de filamentos de polímeros para la fabricación del moldeo. Al mismo tiempo otros filamentos blandos forman apoyo para las superficies libremente suspendidas del moldeo, para poder ser construidas. La máquina de *FDM* posee una plataforma recubierta por una espuma densa y flexible que se mueve en sentido vertical (eje *z*) y un cabezal equipado con dos boquillas extrusoras del filamento calentado: una para la
15 alimentación de las capas de modelo diseñado y otra para la construcción de los soportes. Los filamentos se almacenan en la máquina, la cual es calentada el vacío. Las boquillas de extrusión son alimentadas a través de dos quías giratorias conectadas a un motor que van transportando los filamentos almacenados en un rollo. El software utilizado por el equipo *FDM* es una combinación de *CAD/CAM* no integrado a la
20 máquina, que se conecta al ordenador con el sistema *CAM*, que se encarga del monitoreo de las órdenes de construcción.

Una vez se ha obtenido el cuerpo o estructura 3D de los materiales adecuados, se procede a integrar en dicha estructura alginato de sodio que posteriormente se entrecruzarán con cloruro de calcio y cloruro de zinc para dar lugar al andamio de la
25 presente invención.

Esta parte del proceso de fabricación, según se muestra en la Figura 2, comprende en de forma esquemática las siguientes etapas:

que comprende las siguientes etapas:

- a) Impresión 3D de un soporte, estructura o cuerpo poroso polimérico (1);
- 30 b) Inmersión a vacío de la estructura en una disolución acuosa de alginato de sodio (2,3);
- c) Sonicación (4);

d) Inmersión de la estructura de polímero + alginato sódico en una disolución acuosa de cloruro cálcico (5,6);

e) Inmersión de la estructura de polímero +alginato cálcico en una disolución acuosa de cloruro de zinc (7,8)

5 f) Purificación o lavado del andamio (10); y

g) Secado en horno (9).

En concreto, una vez se ha obtenido el soporte poroso, el proceso comprende rellenar a vacío la estructura o cuerpo poroso con alginato de sodio y posteriormente entrecruzar con cloruro de calcio y cloruro de zinc. En este proceso de fabricación la cantidad de calcio y zinc son clave en la exitosa biofuncionalidad del soporte: carácter antimicrobiano y capacidad de regeneración ósea sin producir toxicidad. El zinc es un compuesto muy tóxico que entrecruzado como cloruro de zinc debe de quedar en una cantidad mínima que permita dotar al andamio con capacidad antimicrobiana y regenerativa sin producir efectos tóxicos. Esto se consigue entrecruzando el soporte inicialmente por inmersión en una disolución acuosa de cloruro de calcio poco concentrada, 0.2 – 0.7% p/v, preferiblemente 0.5 % p/v, durante 7 – 15 minutos, preferiblemente 10 minutos. De este modo, se consigue inicialmente enlazar gran cantidad de cargas negativas presentes en las cadenas poliméricas del alginato de sodio con los cationes divalentes del calcio y conseguir consistencia sólida del relleno.

10

15

20 A continuación, se procede a entrecruzar con cloruro de zinc para cargar el alginato con una cantidad mínima que proporcione al soporte la biofuncionalidad deseada, capacidad antimicrobiana y de regeneración ósea, sin producir toxicidad. Se utiliza para ello una disolución acuosa de cloruro de zinc poco concentrada, 0.25 – 0.5 % p/v, preferiblemente 0.5 % p/v durante 7- 15 minutos, preferiblemente 10 minutos.

25

30 Posteriormente, los soportes son purificados mediante al menos 3 lavados de cada andamio, por ejemplo, en 200 mL de agua destilada durante 10 – 20 minutos, preferiblemente 15 minutos cada vez con agitación magnética a una temperatura de entre 20 – 35°C, preferiblemente 25°C. Posteriormente se secan los andamios durante 24 - 48 horas en estufa inferior a la de degradación de los andamios, preferiblemente a una temperatura de entre 40 – 70°C, preferiblemente a 60°C.

Este método desarrollado presenta la gran ventaja respecto a cualquier otro tipo de proceso en que mediante escáner 3D se puede determinar las dimensiones exactas de

un defecto óseo generado por accidente o enfermedad y así poder producir piezas 3D a medida con las dimensiones y forma requeridas en cada caso para cada paciente. El proceso de síntesis permite además la incorporación adicional de nanomateriales conductores como los nanomateriales de carbono conductores (grafeno, óxido de grafeno, nanofibras de carbono, grafito, óxido de grafeno reducido, grafeno reducido, 5 nanotubos de carbono de pared simple o múltiple, fullereno, óxido de grafeno funcionalizado con alquilamina o con amoniaco, grafeno dopado con boro, grafeno dopado con nitrógeno, grafeno dopado con fósforo, grafeno dopado con azufre, grafeno dopado con boro y nitrógeno, grafeno dopado con fósforo y nitrógeno, grafeno dopado con azufre y nitrógeno y óxido de grafeno reducido sulfonado), nanocompuestos con 10 nanomateriales de carbono como el grafeno/TiO₂, grafeno/Fe₃O₄, grafeno/Mn₃O₄, grafeno/Pd, grafeno/Pt, grafeno/PtCo, grafeno/PtPd, grafeno reducido/TiO₂, grafeno reducido/Fe₃O₄, grafeno reducido/Mn₃O₄, grafeno reducido/Pd, grafeno reducido/Pt, grafeno reducido/PtCo y grafeno reducido/PtPd)) y nanopartículas de polipirrol, etc., a través del relleno de alginato. Al introducir nanomateriales conductores se consigue 15 aumentar la conductividad eléctrica en el soporte que puede utilizarse para aumentar la capacidad regenerativa y antimicrobiana al aplicar estimulación eléctrica. El proceso de síntesis permite también la introducción adicional de otros tipos de nanomateriales, nanopartículas y/o nanofibras como las nanopartículas de plata, oro, nanocelulosa, 20 nanoarcillas, cerámicas, etc.

La impresión 3D por tanto facilita la obtención de andamios personalizados con forma y dimensiones específicas a la lesión ósea a reconstruir, incluidos los defectos óseos críticos.

25 A modo de ejemplo, las dimensiones pueden abarcar desde 1. a 40.cm, y las formas varían desde planas a cilíndricas o con la forma deseada según la aplicación ósea

Uso del andamio

El andamio objeto de la presente invención encuentra aplicación en la reconstrucción 30 de defectos o lesiones óseas producidas por diferentes causas ya sea aquellas denominadas defectos segmentarios, producidos por trauma, tumores osteolíticos, heridas de arma de fuego, por ejemplo, o los ocasionados como consecuencia de procesos de osteoartritis, cirugía por osteomielitis o incluso cirugía tumoral. También

se prevé la aplicación de los andamios según la presente invención para la regeneración de defectos óseos estructurales, cuya causa pudiera ser osteoporosis, osteopenia o enfermedad ósea metabólica. En particular los andamios de acuerdo con la presente invención están especialmente destinados en procesos de reconstrucción ósea de defectos óseos críticos, los cuales se definen como aquellos defectos donde el organismo no consigue promover el reparo tecidual de tejido óseo formándose, únicamente, un tejido cicatricial, hay una incapacidad de reemplazar una pérdida ósea abundante y no osifica de manera espontánea. Esto ocurre generalmente cuando el tamaño del defecto es mayor a 1 – 2 com o cuando hay una pérdida de más del 50% de la circunferencia del hueso

Actividad regeneradora y antibacteriana

El andamio de la presente invención ejerce actividad osteoinductora así como antibacteriana frente a infecciones causadas por específicamente las bacterias Gram positivas, tal como *Staphylococcus aureus*. El andamio de la presente invención ha mostrado tener gran capacidad antibacteriana incluso frente a la bacteria multirresistente *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina.

En conclusión, la presente invención presenta un andamio poroso biodegradable antimicrobiano de fácil, económica y reproducible fabricación con gran capacidad antimicrobiana, incluso frente a patógenos multirresistentes, y con capacidad de regeneración ósea y propiedades mecánicas y de absorción de agua adecuadas, su proceso de fabricación y su aplicación en la ingeniería tisular ósea. El soporte poroso se ha preparado inicialmente mediante impresión 3D por la técnica de Fuse Deposition Modeling (FDM) de ácido poliláctico (PLA) resultando en un método de preparación muy reproducible, automatizado y que permite el diseño específico para cada defecto óseo con gran precisión (impresión 3D). Además, el proceso de fabricación está de acuerdo con los principios de la química verde y desarrollo sostenible utilizando agua como disolvente y empleando la mínima energía eléctrica en la preparación. Los materiales seleccionados (ácido poliláctico y alginato) son biomateriales aprobados por la FDA de Estados Unidos para su uso biomédico en humanos. El material de relleno (alginato) es de origen natural y por tanto renovable. Ambos polímeros son biodegradables y por tanto se espera que sean biodegradados

dentro del organismo humano conforme el hueso va regenerando. Son polímeros de precio bajo comparado con otros existentes en el mercado. Además, la invención presenta la gran ventaja de producir un andamio antimicrobiano que previene infecciones, incluidas las multirresistentes como se ha comprobado por el grupo de investigación *in vitro* y en los ensayos *in vivo*. La invención además proporciona la posibilidad de incorporar nanomateriales de todo tipo a través del rellenado a vacío de la fase de alginato. Por tanto, el material denominado UCV-1 presenta grandes ventajas respecto a toda producido hasta ahora para regeneración de defectos óseos de gran tamaño. La invención puede además ser utilizada para otras aplicaciones como la regeneración de otro tipo de tejidos mediante el diseño de andamios con la morfología requerida para cada tejido: regeneración neuronal, muscular, etc.; realizando otro tipo de diseño por impresión 3D: apósitos reforzados antibacterianos para cura de heridas; como materiales biodegradables para con capacidad antibacteriana para suministro controlado de fármacos; fabricación de catéteres biodegradables antibacterianos; materiales hidrogeles para inmovilización de células o enzimas en bioprocesado eliminando el gran problema habitual de la contaminación bacteriana.

Ejemplos:

20 Ejemplo 1:

1.1. Diseño y fabricación de los andamios

Se fabricaron andamios de ácido poli-láctico (PLA) con y sin relleno de alginato entrecruzado con cationes de calcio y zinc mediante la tecnología de impresión 3D por el Grupo de Investigación de Biomateriales y Bioingeniería del Centro de Investigación Traslacional San Alberto Magno de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (UCV). Por tanto, los andamios fabricados con material de ácido poliláctico se le denominará de aquí en adelante como andamios UCV-0 y andamios de acuerdo con la presente invención constituidos a partir de PLA con relleno de alginato entrecruzado se denominarán de aquí en adelante como andamios UCV-1. Los andamios se han desarrollado para este estudio con una sección transversal de 10 mm de diámetro y longitud de 20 mm (Figura 1). Para ambos diseños, se fabricaron por impresión 3D, 4 réplicas de andamios para el grupo UCV-0 y 4 réplicas para el grupo UCV-1.

La estructura, cuerpo o soporte poroso de ácido poliláctico (PLA) se ha preparado inicialmente mediante impresión 3D por la técnica de modelado por deposición fundida (FDM). En la Figura 1 se presenta una imagen de las vistas del andamio de PLA diseñado para impresión en 3D.

- 5 Posteriormente el soporte poroso ha sido rellenado a vacío con alginato de sodio que posteriormente se entrecruzó con cloruro de cálcico y cloruro de zinc. El rellenado se lleva a cabo mediante inmersión del soporte en las distintas disoluciones. El esquema del proceso de fabricación del andamio puede observarse en el siguiente esquema de la Figura 2.
- 10 En este proceso de fabricación la cantidad de calcio y zinc son clave en la exitosa biofuncionalidad del soporte: carácter antimicrobiano y capacidad de regeneración ósea sin producir toxicidad. Esto se consigue entrecruzando el soporte inicialmente por inmersión en una disolución acuosa de cloruro de calcio poco concentrada (rango óptimo de concentración de cloruro de calcio determinado experimentalmente 0.5 %
- 15 p/v) durante 10 minutos y posteriormente también por inmersión en una disolución acuosa de cloruro de zinc poco concentrada (rango adecuado de concentración de cloruro de zinc determinado experimentalmente 0.25 – 0.5 % p/v) durante 10 minutos. De este modo, se consigue inicialmente enlazar gran cantidad de cargas negativas presentes en las cadenas poliméricas del alginato de sodio con los cationes divalentes
- 20 del calcio y conseguir consistencia sólida del relleno. Posteriormente, los soportes son purificados mediante al menos 3 lavados de cada scaffold en 200 mL de agua destilada durante 15 minutos cada vez con agitación magnética a 25°C. Por último se secan los andamios durante 48 horas en estufa inferior a la de degradación de los andamios, preferiblemente a 60°C.

25

1.2. Ensamblaje in vitro del sistema de estabilización

- Se realizó una prueba in vitro en cada uno de los dos diseños, en la cual el andamio se fijó a una placa bloqueada de titanio de 2,7 mm de 10 orificios (PAX®, Securos Surgical®, Estados Unidos) con dos tornillos de titanio de 2,7 mm de diámetro por 12
- 30 mm de longitud (PAX®, Securos Surgical®, Estados Unidos) (Figura 3).

Una vez revisada la correcta disposición de los implantes, se procedió a su esterilización mediante el sistema ASP STERRAD® NX® (Estados Unidos), un sistema de esterilización de baja temperatura con gas plasma. Cada implante estaba compuesto

por un andamio, 2 tornillos y una placa bloqueada, por lo que fueron empleados 8 implantes en total; 4 para el grupo UCV-0 y 4 para el grupo UCV-1.

1.3. Diseño, elección y realización del modelo del defecto óseo crítico

5 En el presente estudio, se eligió un modelo de defecto óseo segmental de sección completa de 20 mm en la diáfisis femoral media. Para la creación de este defecto óseo, se realizó in vivo una osteotomía completa de 20 mm en la diáfisis femoral media de la extremidad posterior izquierda de los individuos del modelo animal que se empleó en el estudio, asegurando que dicha localización permitiera la correcta aplicación de los
10 implantes.

1.4. Modelo animal empleado

Para la realización del estudio piloto se han empleado 8 individuos lagomorfos (*Oryctolagus cuniculus*) de raza New Zealand, hembras de 1 año de edad. Dichos
15 individuos fueron distribuidos de manera aleatoria en 2 grupos de tratamiento, grupo UCV-0 y grupo UCV-1. Cada grupo constaba de 4 individuos. El tiempo total del estudio estimado fue de 12 semanas (2 semanas de cuarentena + 10 semanas de evolución postquirúrgica). El presente estudio experimental fue aprobado tanto por el Comité de Ética del Instituto de Investigación de La Fe, así como por su Órgano Habilitado;
20 obteniendo la autorización de la Consellería de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Comunidad Valencia, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto RD53/2013.

1.5. Manejo pre-quirúrgico

25 En primer lugar, los individuos permanecieron en un periodo de cuarentena de 14 días en el animalario del Instituto de Investigación de La Fe antes del procedimiento quirúrgico. Transcurridos los 14 días de cuarentena, se procedió a la intervención quirúrgica en la que se creó el defecto óseo crítico para la colocación posterior del andamio con el sistema de estabilización.

30 Durante el manejo pre-anestésico, se realizó una exploración física completa en la que se pesó a los individuos. Tras el pesaje, se calculó la pre-medicación para cada individuo. La pre-medicación consistía en Medetomidina (50 g/kg, Domtor® 1mg/ml solución inyectable, Ecuphar, Finlandia), Fentanilo (10 g/kg, Fentanest® 0,05 mg/ml

solución inyectable, Kern pharma, España), Ketamina (5 mg/kg, Imalgene® 100 mg/ml solución inyectable, Merial, España) y Midazolam (0,5 mg/kg, Midazolam Normon® 15 mg/3 ml solución inyectable, Laboratorios Normon, España). Se administró vía intramuscular una combinación de las anteriores en la misma jeringa. Una vez el individuo estaba bajo sedación, se procedía a la cateterización de la vena marginal de la oreja, y al rasurado de la extremidad posterior izquierda, así como a su lavado y preparación aséptica. Posteriormente, se procedió a la inducción de los individuos mediante la administración de Propofol (2 mg/kg, Propovet Multidosis® 10 mg/ml emulsión inyectable, Ecuphar, España) vía intravenosa para, tras la intubación endotraqueal, proceder al mantenimiento con Isoflurano inhalatorio (Isofluteck® 1000 mg/g, Karizoo, España) siguiendo la CAM referenciada para esta especie; 3,7 +/- 0,16% 29 vía inhalatoria. Como analgesia intraquirúrgica se administró en infusión continua intravenosa, Fentanilo (0,01 mg/kg, Fentanest® 0,05 mg/ml solución inyectable, Kern pharma, España). Del mismo modo, se administró el antibiótico Enrofloxacino (10 mg/kg, Baytril® 50 mg/ml solución inyectable, Bayer, España) vía intravenosa, también en el periodo intraquirúrgico.

1.6. Procedimiento quirúrgico en el modelo animal

El individuo se colocó en decúbito lateral derecho una vez la extremidad estaba preparada de manera aséptica. Se cubrió al paciente con paños quirúrgicos, dejando libre la extremidad posterior izquierda.

En cuanto al abordaje, se realizó un abordaje craneolateral al fémur de modo convencional, según lo descrito por Piermattei (2014) (Figura 4A). Tras la incisión cutánea, se realizó una incisión en la lámina superficial de la fascia lata a lo largo del borde craneal del músculo bíceps femoral de la longitud de la incisión. Se retrajo el bíceps femoral caudalmente para exponer el músculo vasto lateral. Se hizo una incisión en el tabique fascial del vasto lateral en su inserción en el borde lateral caudal del fémur. Se retiró el vasto lateral de la superficie del fémur para exponer la diáfisis femoral (Figura 4B).

En cuanto a la creación del defecto óseo crítico, una vez expuesta la diáfisis femoral, se realizó una ostectomía de la diáfisis femoral media de 20 mm de longitud creando así el defecto óseo crítico. Para realizar de forma correcta la ostectomía, se marcó primero el hueso con la sierra de corte posicionando en un lateral la placa con el andamio para

seccionar la longitud exacta que tenía el andamio. (Figura 4C). Una vez eliminado el segmento de hueso, se fijaron los dos extremos del hueso femoral con pinzas de reducción para mantener la posición anatómica y se posicionó el andamio en el defecto óseo crítico creado.

- 5 Respecto a la reducción de la fractura con andamio, una vez posicionado de manera correcta, se redujo la placa con pinzas de reducción para evitar su movimiento (Figura 4D). Posteriormente, se taladró el orificio de la placa con la guía para brocas hasta que se taladraron las dos corticales del hueso (Figura 4E).

Respecto a la fijación y estabilización de la fractura, se fijó la placa de titanio a los dos
10 fragmentos del fémur con dos tornillos colocados en los orificios más distales de ambos extremos de la placa (Figura 4F).

Finalmente, respecto al cierre del abordaje, tras realizar un lavado de la zona con suero salino fisiológico, se procedió al cierre del abordaje por planos con una sutura de gliconato de 4/0 (Monosyn®, B. Braun, Alemania) en patrón continuo simple de
15 aposición.

1.7. Manejo post-quirúrgico en el modelo animal

Una vez finalizada la intervención, se administró vía intravenosa Metoclopramida (0,5 mg/kg, Primperan® 10 mg/2ml solución inyectable, Sanofi, España) y Ranitidina (2
20 mg/kg, Ranitidina Normon® 10 mg/ml solución inyectable EFG, Laboratorios Normon, España); y vía subcutánea Meloxicam (0,4 mg/kg, Metacam® 2 mg/ml solución inyectable, Boehringer, Alemania). Posteriormente, los pacientes volvieron a la sala de estabulación del animalario. Cada individuo permaneció en un box individualizado con restricción de movimiento durante 10 semanas.

25 Finalmente, los individuos se sacrificaron 10 semanas después del procedimiento quirúrgico. Una vez el individuo estaba bajo sedación, siguiendo el protocolo anteriormente descrito, se procedió a la cateterización de la vena marginal de la oreja, para administrar posteriormente una sobredosis de solución comercial de Pentobarbital
30 sódico (Dolethal® 200 mg/ml solución inyectable, Vetoquinol, España).

1.8. Evaluación funcional del andamio: evaluación tomográfica

Tras el sacrificio de los individuos se realizó un estudio tomográfico con un scanner de 16 cortes (Siemens Somatom Scope® 16, Alemania). Para ello, los individuos se

posicionaron en decúbito dorsal y se escanearon con ajustes de 130 kVp, 170 mAs, en algoritmo de tejido blando y hueso, con grosor de corte de 1 mm.

Para el análisis de las imágenes, se utilizó un software de visualización de imágenes DICOM disponible comercialmente (Aycan Workstation v3.6) usando una ventana de
5 tejido blando (ancho: 350 UH; nivel: 40 UH) y una de hueso (ancho: 2000 UH, nivel: 600 UH).

La evaluación del grado de osificación de los defectos óseos se realizó de dos modos independientes. El primer modo consiste en la valoración cuantitativa mediante la medición de las Unidades Hounsfields (UH) y para ello se seleccionaron 6 puntos
10 independientes, en localización cortical media y medular a nivel proximal, medio y distal del defecto óseo. El segundo modo consistió en la valoración semicuantitativa del grado de osificación del defecto óseo, según la escala descrita por Stacy y cols. (2014). [20].

1.8. Caracterización físico-química de los soportes

15 Los soportes porosos UCV-0 y UCV-1 han sido caracterizados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), absorción de agua, ensayos mecánicos de compresión en estado seco y en estado hinchado después de inmersión en agua durante 24 horas a 37°C (temperatura del cuerpo humano).

20 1.9. Caracterización antibacteriana de los soportes

Las propiedades antibacterianas de los soportes han sido caracterizadas frente a una bacteria Gram-positiva MRSA y una Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* mediante el método de difusión en agar.

25 2. Resultados

2.1. Evaluación del modelo experimental

El procedimiento de creación del defecto óseo crítico en fémur, así como la colocación del andamio en dicha localización anatómica, se realizó de forma satisfactoria en todos los individuos, sin que se evidenciaran complicaciones relevantes durante el
30 procedimiento quirúrgico. Uno de los individuos del grupo de UCV-0 falleció una hora tras el procedimiento quirúrgico, por causas ajenas al modelo experimental o al objeto de estudio. Asimismo, un individuo del grupo UCV-1 fue sacrificado a las dos semanas después de la cirugía por una infección a nivel del foco quirúrgico, y otros dos también

del grupo CTR (grupo tratado con UCV-0) a las cuatro semanas por un colapso de la fractura, que redundó en una pérdida del alineamiento y estabilización de la misma. Por estos motivos, al periodo final del estudio llegaron un total de 4 individuos, 1 perteneciente al grupo CTR (25% de los individuos intervenidos y recuperados del procedimiento anestésico) y 3 pertenecientes al grupo de TTO (grupo tratado con UCV-1) (100% de los individuos intervenidos y recuperados del procedimiento anestésico) (Tabla 1).

Tabla 1. Seguimiento de individuos

Número Animal	Grupo	Intervención quirúrgica	Supervivencia tras cirugía	Infección tras cirugía	Colapso de la fractura
1	CTR	Sí	2 semanas	2 semanas	-
2	CTR	Sí	4 semanas	No	4 semanas
3	CTR	Sí	4 semanas	No	4 semanas
4	CTR	Sí	10 semanas	No	No
5	TTO	Sí	0 semanas	-	-
6	TTO	Sí	10 semanas	No	No
7	TTO	Sí	10 semanas	No	No
8	TTO	Sí	10 semanas	No	No

10

2.2. Evaluación funcional del andamio

2.2.1. Evaluación tomográfica

Como se ha comentado anteriormente, la evaluación del grado de osificación de los defectos óseos se realizó de dos modos independientes: una valoración cuantitativa mediante la medición de las UH, y una valoración semi-cuantitativa según la escala descrita por Stacy y cols. (2014) [20]. A continuación, en la Tabla 2 se exponen los resultados en UH para cada una de las regiones evaluadas, así como la media de cada una de ellas para zona cortical (periférica) como medular (central).

20

Tabla 2. Resultados de las UH de 6 puntos independientes del defecto óseo de los 4 individuos.

25

Individuo	Cortical media (UH)				Medular (UH)			
	Proximal	Medio	Distal	Valor medio de cortical media ()	Proximal	Medio	Distal	Valor medio de medular ()
UCV-0	67	47	529	214.33	125	28	24	59
UCV-1	1403	270	318	642.67	449	118	191	252.67
UCV-1	315	118	143	192	190	-60	214	114.67
UCV-1	634	1998	99	901.33	167	245	75	162.33

De forma resumida, podemos observar como la media general en el grupo TTO fue de 578.67 UH en región cortical media, y de 176.56 UH en región medular, frente a 214.33 UH y 59 UH respectivamente del grupo CTR.

- 5 Para la valoración semi-cuantitativa, se valoró el grado de osificación del defecto óseo crítico generado en los individuos a partir de la escala descrita por Stacy y cols. (2014) [20]. Como se observa en la Tabla 3, el individuo CTR-1 obtuvo una puntuación de 3 en la escala. En cambio, los individuos del grupo TTO, individuo TTO-1, TTO-2 y TTO-3 obtuvieron una puntuación de 4, 2 y 4, respectivamente.

10

Tabla 3. Resultados del grado de osificación del defecto óseo siguiendo la escala descrita por Stacy y cols. (2014) [20].

Individuo	Puntuación
UCV-0	3
UCV-1	4
UCV-1	2
UCV-1	4

- 15 Donde, de acuerdo con Stacy y cols. (2014) [20], la puntuación 2 indica signos que sugieren una mínima o temprana osificación con una mineralización leve entre fragmentos óseos sin contacto, un puente fino que conecta ambos fragmentos óseos, o contacto cercano entre ambos fragmentos con márgenes de osteotomía escleróticos. La puntuación 3 indica osteosíntesis leve con un puente a lo largo de menos del 50% de la
- 20 dimensión anteroposterior de ambos fragmentos, con los fragmentos óseos desplazados o alineados en la dimensión anteroposterior. La puntuación 4 indica osteosíntesis moderada con puente a lo largo del 50% o más de la dimensión

anteroposterior de ambos fragmentos, con los fragmentos óseos desplazados o alineados en la dimensión anteroposterior con restos visibles de la ostectomía previa.

Del mismo modo, también se observa en una gráfica los resultados obtenidos del grado de osificación del defecto óseo siguiendo la escala descrita por Stacy y cols. (2014) [20]

5 (Figura 5).

En la Figura 6 se puede observar una comparación tomográfica de la osificación de los fragmentos óseos entre el grupo control UCV-0 y el grupo UCV-1. En esta figura se observa un grado de maduración del callo más avanzado en el grupo UCV-1 que en el grupo UCV-0.

10

2.2.2. Caracterización antibacteriana de los andamios

Los andamios UCV-1 mostraron capacidad antibacteriana frente a la bacteria Gram-positiva multirresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) y frente a la Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ver Figura 7).

15 Tal y como se muestra en la Figura 7, se puede observar como el andamio UCV-1 produce un halo inhibitorio muy claro alrededor con la bacteria Gram-positiva MRSA y no tan potente pero claramente observable frente a la bacteria Gram-negativa, a diferencia del andamio UCV-0 que no inhibe el crecimiento bacteriano.

20 2.2.3. Caracterización físico-química de los andamios

Los resultados de espectroscopía FTIR confirman la síntesis del relleno de alginato entrecruzado en el soporte de PLA, ya que en la figura 8(b) aparece un pico ancho (entre 4000 y 3500 cm^{-1}) en la zona característica de los grupos hidrófilos OH del alginato en comparación con su ausencia en el soporte de PLA sin relleno, figura 8(a).

25

Además, según se muestra en la Tabla 4, el resultado de absorción en inmersión muestra a temperatura del cuerpo humano (37°C) que el andamio UCV-1 absorbe agua más rápidamente y mayor cantidad al contener el relleno de alginato entrecruzado.

30 **Tabla 4.** Absorción de agua de equilibrio ($h = (\text{masa seca} - \text{masa hinchada}) / \text{masa seca}$) en inmersión a 37°C alcanzado en ambos tipos de andamios desde estado seco (tiempo cero) hasta los 100 días.

Tiempo	h_{UCV-0}	h_{UCV-1}
15 min	0.188±0.041	0.4265±0.017
30 min	0.370±0.065	0.438±0.059
1 hora	0.308±0.054	0.395±0.007
1 día	0.339±0.036	0.461±0.047
25 días	0.329±0.006	0.447±0.053
100 días	0.313±0.010	0.435±0.006

Las propiedades mecánicas de compresión en estado seco e hinchado a 37°C (temperatura del cuerpo humano), que son fundamentales para aplicaciones de regeneración ósea, también mejoran con la incorporación del relleno de alginato entrecruzado con los dos cationes de calcio y zinc (Tabla 5).

Tabla 5. Ensayos mecánicos de compresión de los andamios UCV-0 (control) y UCV-1 en estado hinchado durante 24 horas a 37°C y en estado seco.

Medida	UCV-0	UCV-1	UCV-0	UCV-1
	(estado hinchado)	(estado hinchado)	(estado seco)	(estado seco)
Carga máxima de compresión al máximo esfuerzo compresivo (N)	2322,1±292,9	2978,3±508,2	2708,0±339,8	3616,3±391,3
Máximo esfuerzo compresivo (MPa)	32,6±4,2	47,6±10,1	41,7±5,9	64,2±7,9
Deformación de compresión a la carga máxima de compresión (mm/mm)	0.29±0.03	0.37±0.03	0.41±0.06	0.48±0.05
Módulo de Young en compresión (MPa)	392,0±98,1	574,0±109,4	483,2±63,7	728,1±103,2

Por tanto, el relleno de alginato tanto en estado seco como hinchado dentro del andamio le proporciona integridad física al andamio de PLA mejorando sus propiedades mecánicas de compresión.

5 En conclusión, se ha desarrollado un andamio poroso capaz de regenerar hueso previniendo infecciones, incluidas las multirresistentes que tantos problemas están causando actualmente y la Organización Mundial de la Salud estima que en el año 2050 será la causa principal de fallecimientos superando al cáncer. Es un proceso muy reproducible y muy económico. Además, permite producir andamios a la carta para
10 cada paciente según las necesidades realizando un escaneo previo en el defecto óseo del paciente. El 42% de los individuos fueron sacrificados por problemas de infecciones en el foco de fractura; siendo el 100% de ellos pertenecientes al grupo UCV-0. Sin embargo, se concluye que mediante la evaluación tomográfica, sobre todo en la valoración cuantitativa, se puede observar la formación de callo más maduro en el
15 grupo UCV-1 que en el grupo UCV-0 sugiriendo una osificación más avanzada en el grupo UCV-1 de andamios fabricados con PLA poroso por impresión 3D rellenos de alginato entrecruzado con cationes divalentes de calcio y zinc en la proporción adecuada. Además, estos soportes demostraron tener mayor capacidad de absorción de agua y mejor comportamiento mecánico a compresión en estado seco e hinchados a
20 la temperatura del cuerpo humano. El éxito de la consistencia física para permanecer el relleno de alginato entrecruzado dentro del andamio fue comprobado mediante espectroscopía infrarroja FTIR.

Ejemplo 2: Ensayo histológico

25

1. Metodología

1.1. Obtención de muestras

Tras el sacrificio de los individuos se procedió a la extracción de las muestras histológicas para lo que se expuso la región de la muestra femoral objeto de estudio
30 (diáfisis media de fémur), y mediante el empleo de una hoja de bisturí del número 11 y una sierra oscilante se extrajo la región del andamio con su callo óseo, tomando un margen de 1 cm proximal y distal al mismo.

1.2. Estudio histológico

La porción femoral que incluye el andamio queda fijada en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante al menos 24h, para su posterior descalcificación en una solución de EDTA comercial (Osteodec®, Bio-Óptica; Italia) durante 21 días, (hasta la correcta descalcificación).

- 5 Transcurrido este periodo, las muestras fueron incluidas en bloques de parafina para su sección y posterior conservación. De cada muestra se obtuvieron 3 secciones sagitales de 5 micrómetros de espesor con un micrótopo para su posterior tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E). Los cortes histológicos fueron en primer lugar hidratados y des-parafinados mediante el protocolo habitual de inmersiones en Xilol y alcoholes.

10

1.3. Valoración microscópica

La valoración microscópica se realizó con un microscopio óptico de alta resolución equipado con diferentes objetivos (4X, 10X, 20X, 40X y 60X) (Olympus)

- 15 Las secciones teñidas con H-E, fueron sometidas a evaluación siguiendo la escala semi-cuantitativa modificada descrita para evaluación histológica de defectos óseos críticos (Öztürk et al., 2006) (Figura 9 a+b)

1.4. Resultados.

- 20 A continuación se muestra la Tabla 6 donde se expresan las valoraciones histológicas para cada una de las muestras.

- Tabla 6:** Valores obtenidos en la evaluación histológica para cada individuo: muestra control de material de ácido poliláctico (UCV-0) y las tres réplicas de los andamios constituidos a partir de PLA con relleno de alginato entrecruzado con calcio y zinc (UCV-1)

Muestra	Calidad de la unión	Desarrollo del córtex	Integración del andamio	Puntuación total
UCV-0	1	0	1	2
UCV-1 (Réplica 1)	2	2	2	6
UCV-1 (Réplica 2)	1	0	1	2

UCV-1 (Réplica 3)	2	1	1	4
-------------------	---	---	---	---

Tal y como se ilustra en la Figura 9, en las muestras histológicas se observa una región de transición en el individuo UCV-1 (Réplica 1) formada por tejido fibrocartilaginoso estructurado que se introduce por los poros del andamio logrando una integración adecuada del mismo con el callo fibroso. En otras secciones del mismo individuo (no mostradas en la actual imagen), se encuentran fases de callo más avanzadas en regiones periféricas con tejido cartilaginoso presente. Por el contrario, la muestra UCV-0 evidencia una región de transición formada por un tejido fibroso desestructurado, que no logra introducirse entre los poros del andamio, no logrando la integración esperada del mismo.

En conclusión, el grupo UCV-1 parece mostrar un callo fibrocartilaginoso en alguna de las regiones estudiadas, más avanzado que el observado en el individuo UCV-0. La integración del andamio resultaría mayor en el grupo UCV-1, al permitir la formación de callo fibroso en su trabeculado, además de en su región periférica.

15

Referencias:

- [1] Smrke D, Roman P, Veselko M, Gubi B. Treatment of Bone Defects — Allogenic Platelet Gel and Autologous Bone Technique. En: Andrades JA, editor. Regenerative Medicine and Tissue Engineering. 1ª ed. Londres, Reino Unido: InTechOpen; 2013. p.325-40.
- [2] Ibrahim A. 3D bioprinting bone. En: Thomas DJ, Jessop ZM, Whitaker IS, editores. 3D Bioprinting for Reconstructive Surgery: Techniques and Applications. Londres, Reino Unido: Elsevier Inc.; 2018. p. 245–75.
- [3] Lalwani G, D'Agati M, Farshid B, Sitharaman B. Carbon and Inorganic Nanomaterial-Reinforced Polymeric Nanocomposites for Bone Tissue Engineering. En: Liu H, editor. Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration. 1ª ed. Nueva York, Estados Unidos: Elsevier Inc.; 2016. p. 31-66.
- [4] Ashammakhi N, Hasan A, Kaarela O, Byambaa B, Sheikhi A, Gaharwar AK, et al. Advancing Frontiers in Bone Bioprinting. *Adv Healthc Mater.* 2019; 8 (7): 1–24.
- [5] Cameron JA, Milner DJ, Lee JS, Cheng J, Fang NX, Jasiuk IM. Employing the Biology of Successful Fracture Repair to Heal Critical Size Bone Defects. En: Heber-Katz E, Stocum DL, editores. *New Perspectives in Regeneration. Current Topics in Microbiology and Immunology.* Berlin, Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012. p. 113-32.
- [6] Willie BM, Petersen A, Schmidt-Bleek K, Cipitria A, Mehta M, Strube P, et al. Designing biomimetic scaffolds for bone regeneration: Why aim for a copy of mature tissue properties if nature uses a different approach? *Soft Matter.* 2010; 6 (20): 4976–87.
- [7] Gardel LS. Autologous bone tissue engineering strategies envisioning the regeneration of critical size defects using cell-seeded scaffolds and a newly developed perfusion bioreactor [Tesis doctoral]. Oporto: Universidad de Oporto; 2012.
- [8] Berner A, Reichert JC, Müller MB, Zellner J, Pfeifer C, Dienstknecht T, et al. Treatment of long bone defects and non-unions: From research to clinical practice. *Cell Tissue Res.* 2012; 347 (3): 501–19.
- [9] Keating JF, Simpson AHRW, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg.* 2005; 87-B: 142-50.
- [10] Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone.* 2015; 70: 93–101.
- [11] Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J Orthop Trauma.* 2017; 31 (10): S20–2.
- [12] Calciolari E, Donos N, Mardas N. Osteoporotic Animal Models of Bone Healing: Advantages and Pitfalls. *J Investig Surg.* 2017; 30 (5): 342–50.

- [13] Nauth A, McKee MD, Einhorn TA, Watson JT, Li R, Schemitsch EH. Managing bone defects. *J Orthop Trauma*. 2011; 25 (8): 462–6.
- [14] Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard Tissue*. 2013; 2 (2): 1-13.
- 5 [15] Cross AR. Fracture Biology and Biomechanics. En: Tobias KM, Johnston SA, editores. *Veterinary Surgery: Small Animal*. 1^a ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2011. Volumen 1: p.565-71.
- [16] Brydone AS, Meek D, MacLaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med*. 2010; 224
10 (12): 1329–43.
- [17] Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Av en Periodon Implantol*. 2012; 24 (3): 133–8.
- [18] Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010; 16 (2): 263–71.
15
- [19] Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci: Mater Med*. 2014; 25 (10): 2445–61.
- [20] Stacy GS, Ahmed O, Richardson A, Hatcher BM, Macmahon H, Raman J.
20 Evaluation of Sternal Bone Healing with Computed Tomography and a Quantitative Scoring Algorithm. 2014; 8 (1): 29–35.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un andamio para su utilización en ingeniería tisular ósea que comprende:
- un cuerpo, soporte o estructura porosa con forma tridimensional (3D) constituido a partir de un material polimérico, y
 - un hidrogel de alginato de calcio y zinc, caracterizado porque dicho hidrogel de alginato de calcio y zinc se encuentra integrado en el cuerpo, soporte o estructura porosa, y porque el hidrogel de alginato de calcio y zinc comprende entre 4% a 7% en peso de iones de zinc y 3% a 6% en peso de iones de calcio.
- 2.- Un andamio de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el hidrogel de alginato de calcio y zinc integrado en el cuerpo, soporte o estructura porosa se dispone a modo de recubrimiento o relleno de la estructura o cuerpo poroso de material polimérico.
- 3.- Un andamio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el cuerpo, soporte o estructura porosa con forma tridimensional (3D) está constituida a partir de un material polimérico seleccionado del grupo que comprende: poliésteres alifáticos, poli(aminoácidos), copoli(éter-ésteres), oxalatos de polialquilenos, poliamidas, policarbonatos derivados de tirosina, poli(iminocarbonatos), polioroésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amino, poli(anhídridos), polifosfacenos, biomoléculas, tales como colágeno, elastina, ácido hialurónico, almidones bioabsorbibles, y mezclas de los mismos, poliésteres alifáticos, tales como, homopolímeros y copolímeros de lactida, incluyendo ácido láctico, D-, L- y mesolactida, glicólido, incluyendo ácido glicólico), ϵ -caprolactona, p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona), carbonato de trimetileno (1,3-dioxan-2-ona), derivados de alquilo de carbonato de trimetileno, δ -valerolactona, β -butirolactona, γ -butirolactona, ϵ -decalactona, hidroxibutirato (unidades de repetición), hidroxivalerato (unidades de repetición), 1,4-dioxepan-2-ona, incluyendo su dímero 1,5,8,12-tetraoxaciclotetradecan-7,14-diona, 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-1,4-dioxan-2-ona, 2,5-dicetomorfolina, pivalolactona, alfa, alfa-dietilpropiolactona,

carbonato de etileno, oxalato de etileno, 3-metil-1,4-dioxan-2,5-diona, 3,3-dietil-1,4-dioxan-2,5-diona, 6,8-dioxabicycloctan-7-ona y mezclas de polímeros de los mismos.

4.- Un andamio de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que el cuerpo,
5 soporte o estructura porosa con forma tridimensional (3D) está constituido a partir de ácido poli-láctico (PLA).

5.- Un andamio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
10 caracterizado por que el recubrimiento de alginato de calcio y zinc comprende entre el 1,5 – 2% p/p (respecto al peso total del andamio)

6.- Un andamio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores
15 caracterizado por que el volumen de poros es de 20 a 30% con un tamaño medio de poro de 400 a 600 μm .

7.- Un andamio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
caracterizado por que incorpora opcionalmente componentes seleccionados del grupo
que comprende: grafeno, óxido de grafeno, nanofibras de carbono , grafito, óxido de
grafeno reducido, grafeno reducido, nanotubos de carbono de pared simple o múltiple,
20 fullereno, óxido de grafeno funcionalizado con alquilamina o con amoniaco, grafeno
dopado con boro, grafeno dopado con nitrógeno, grafeno dopado con fósforo, grafeno
dopado con azufre, grafeno dopado con boro y nitrógeno, grafeno dopado con fósforo y
nitrógeno, grafeno dopado con azufre y nitrógeno y óxido de grafeno reducido
sulfonado, nanocompuestos con nanomateriales de carbono como el grafeno/TiO₂,
25 grafeno/Fe₃O₄, grafeno/Mn₃O₄, grafeno/Pd, grafeno/Pt, grafeno/PtCo, grafeno/PtPd,
grafeno reducido/TiO₂, grafeno reducido/Fe₃O₄, grafeno reducido/Mn₃O₄, grafeno
reducido/Pd, grafeno reducido/Pt, grafeno reducido/PtCo y grafeno reducido/PtPd y
nanopartículas de polipirrol, nanopartículas y/o nanofibras como las nanopartículas de
30 plata, oro, nanocelulosa, nanoarcillas ocerámicas.

8.- Un proceso para la obtención de un andamio de acuerdo con las reivindicaciones 1
a 7 que comprende las siguientes etapas:

a) Impresión 3D de un soporte, estructura o cuerpo poroso polimérico (1);

- b) Inmersión a vacío de la estructura en una disolución acuosa de alginato de sodio (2,3);
- c) Sonicación (4);
- d) Inmersión de la estructura de polímero + alginato sódico en una disolución acuosa de cloruro cálcico (5,6);
- 5 e) Inmersión de la estructura de polímero +alginato cálcico en una disolución acuosa de cloruro de zinc (7,8)
- f) Purificación o lavado del andamio (10); y
- g) Secado en horno (9).
- 10
- 9.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que la impresión 3D del soporte, estructura o cuerpo poroso se lleva a cabo con la técnica de modelado por deposición fundida.
- 15 10.- Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 8 – 9, caracterizado por que la inmersión a vacío de la estructura en la etapa b) se realiza en una disolución acuosa de alginato de sodio a una concentración de 2% p/v.
- 11.- Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 8 – 10, caracterizado por que la
- 20 inmersión de la estructura en la etapa c) se realiza en una disolución acuosa de cloruro de calcio a una concentración de 0.5% p/v y la inmersión de la estructura en la etapa d) se realiza en una disolución acuosa de cloruro de zinc a una concentración de 0.5% p/v.
12. - Un andamio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso
- 25 en procesos reconstructivos de defectos óseos tales como: defectos segmentarios, defectos producidos por trauma, tumores osteolíticos, heridas de arma de fuego, defectos causados por osteoartrosis, cirugía, osteomielitis, cirugía tumoral, defectos óseos estructurales, defectos causados por osteoporosis, osteopenia y/o enfermedad ósea metabólica.
- 30
- 13.- Un implante, injerto y sustituto de injerto óseo que comprende un andamio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12.

FIG. 1

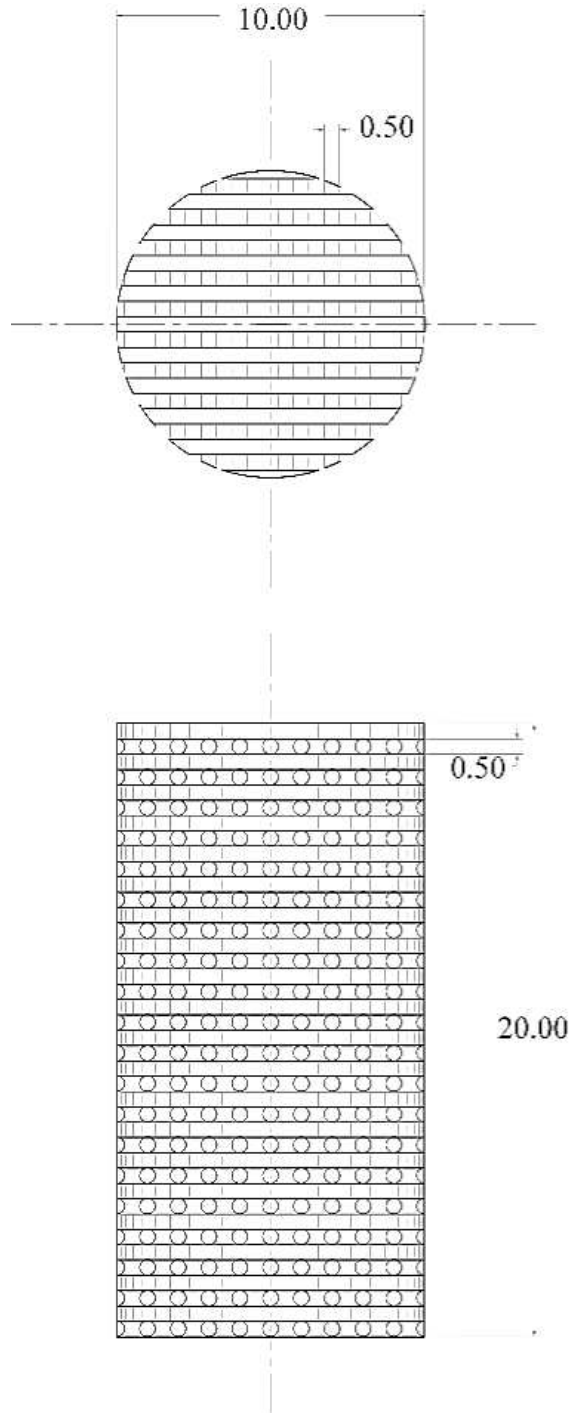


FIG. 2

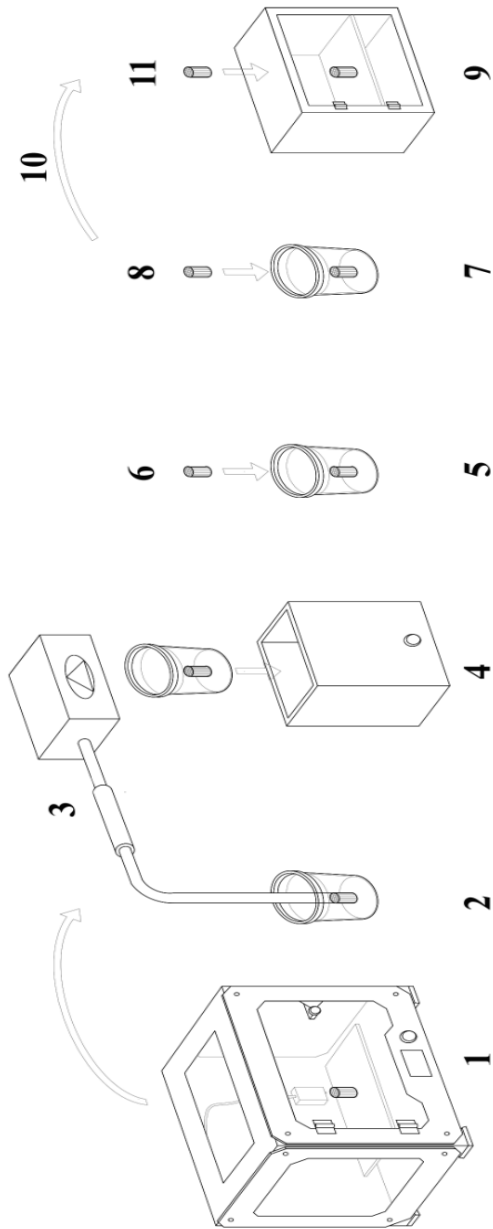


FIG. 3

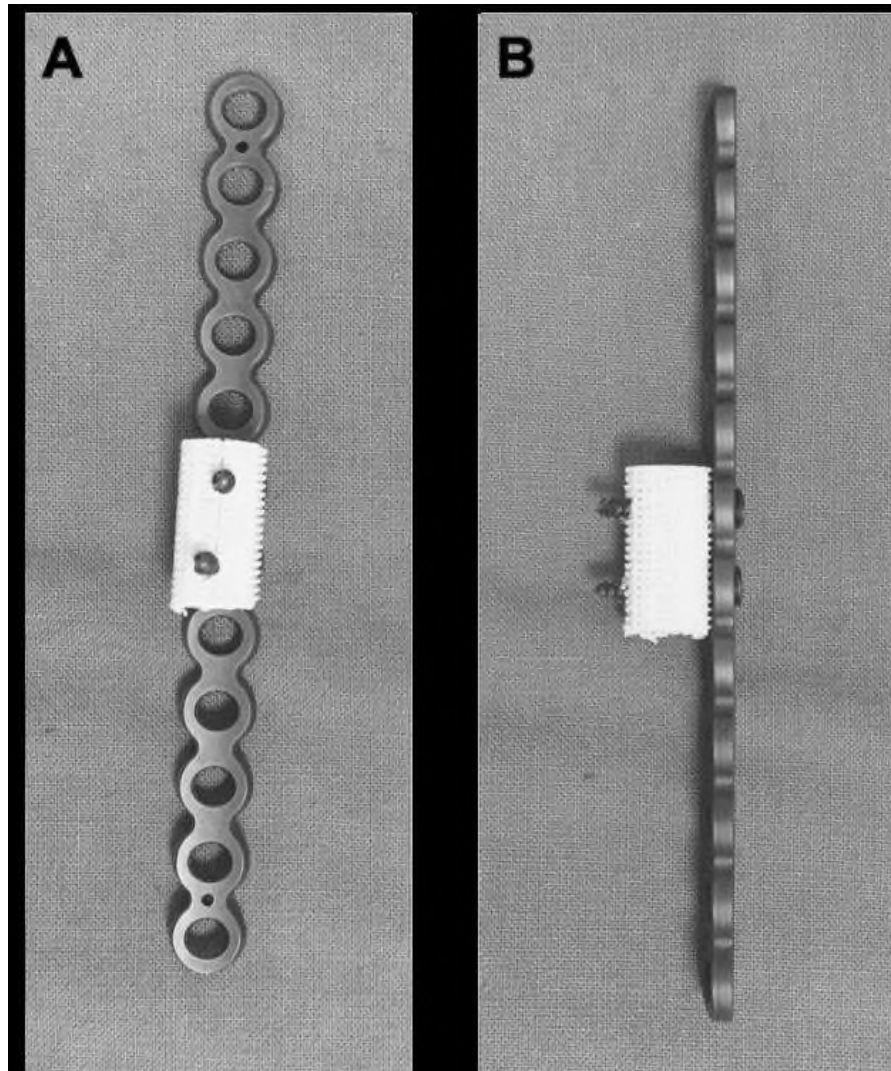


FIG. 4

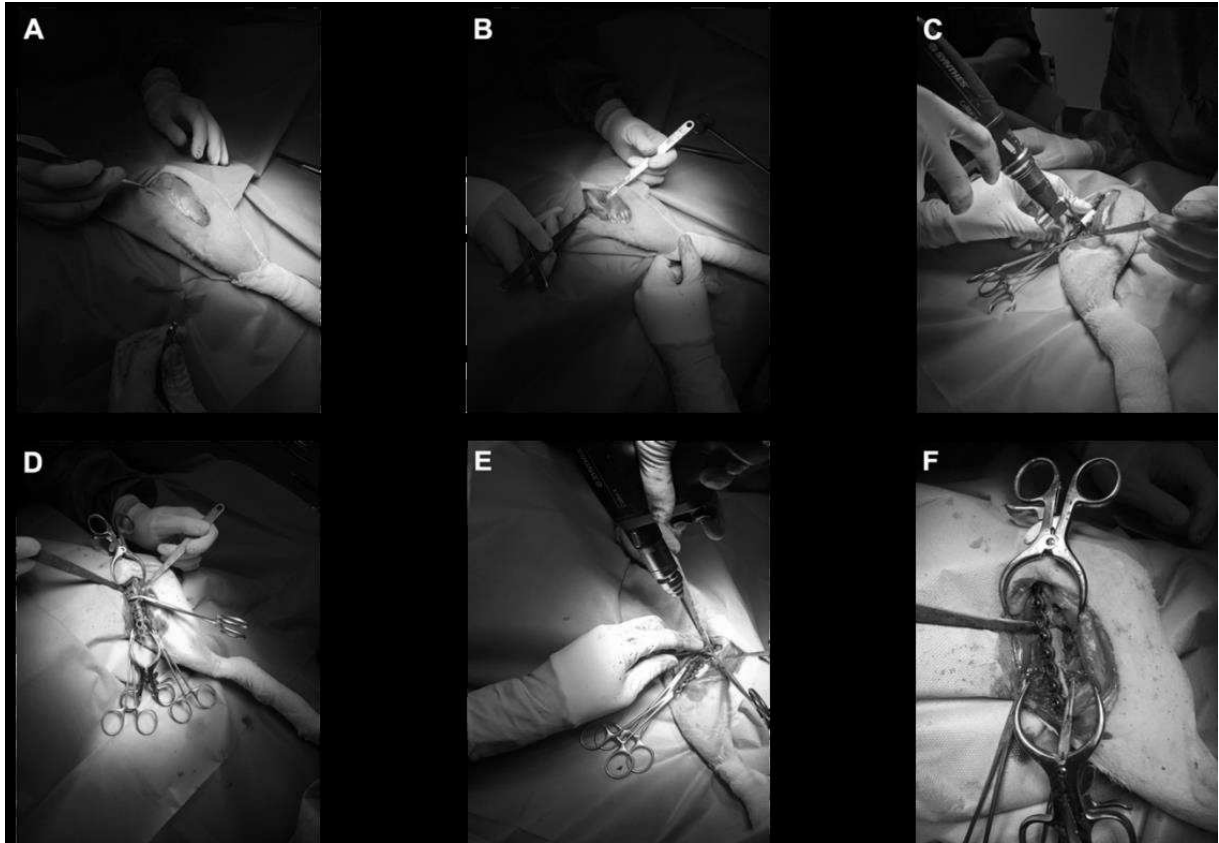


FIG. 5

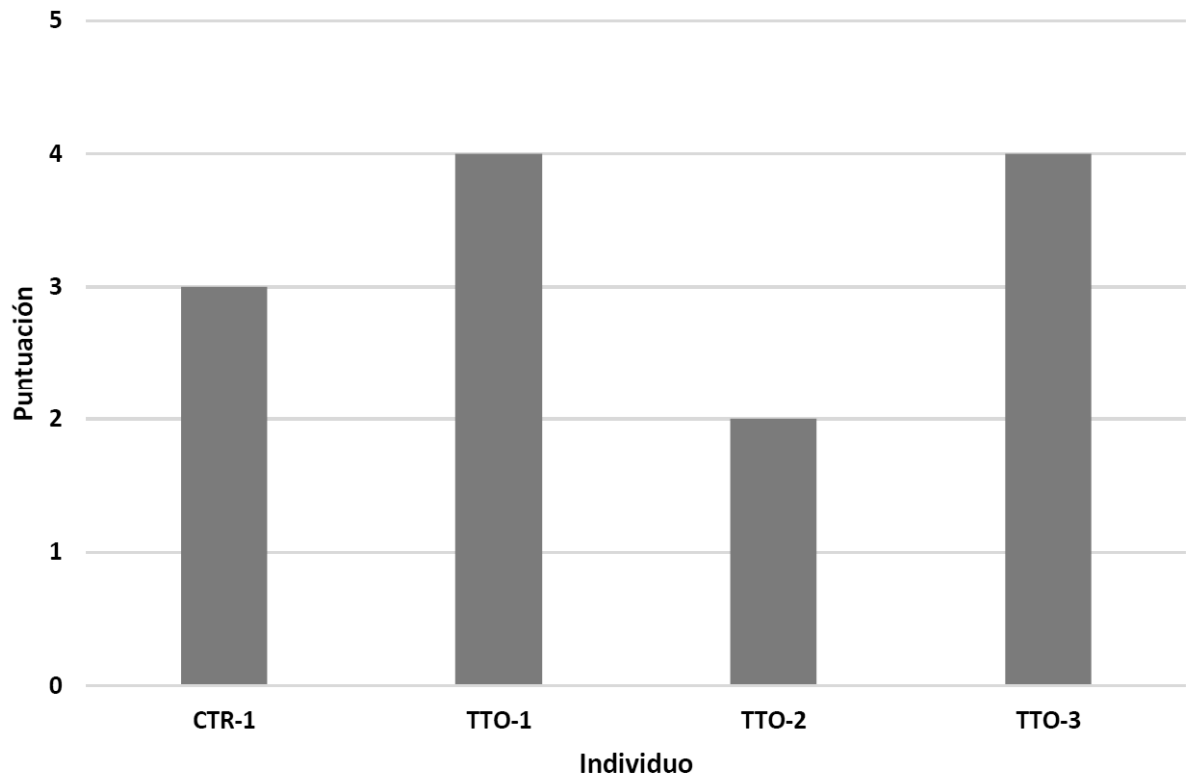


FIG. 6



FIG. 7

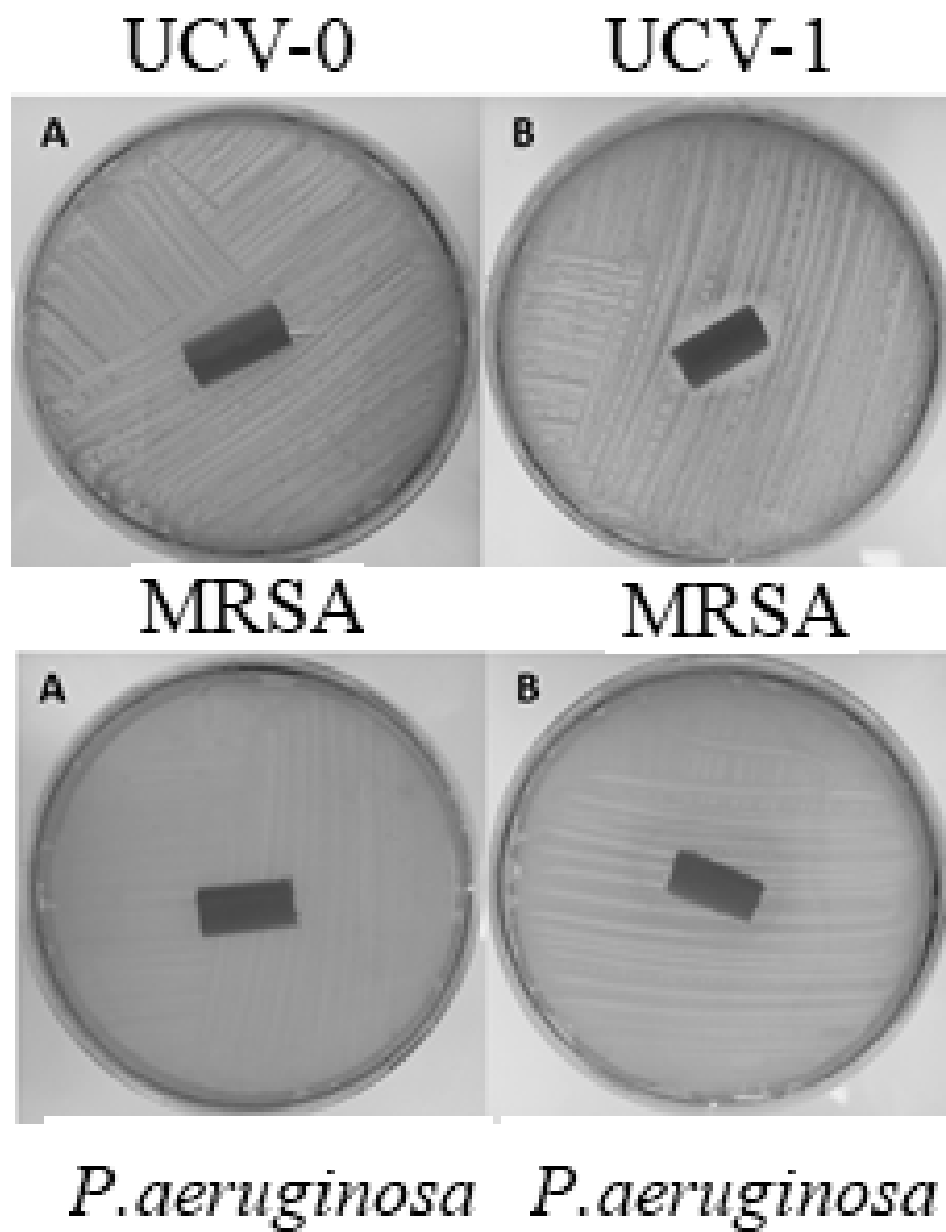


FIG. 8A

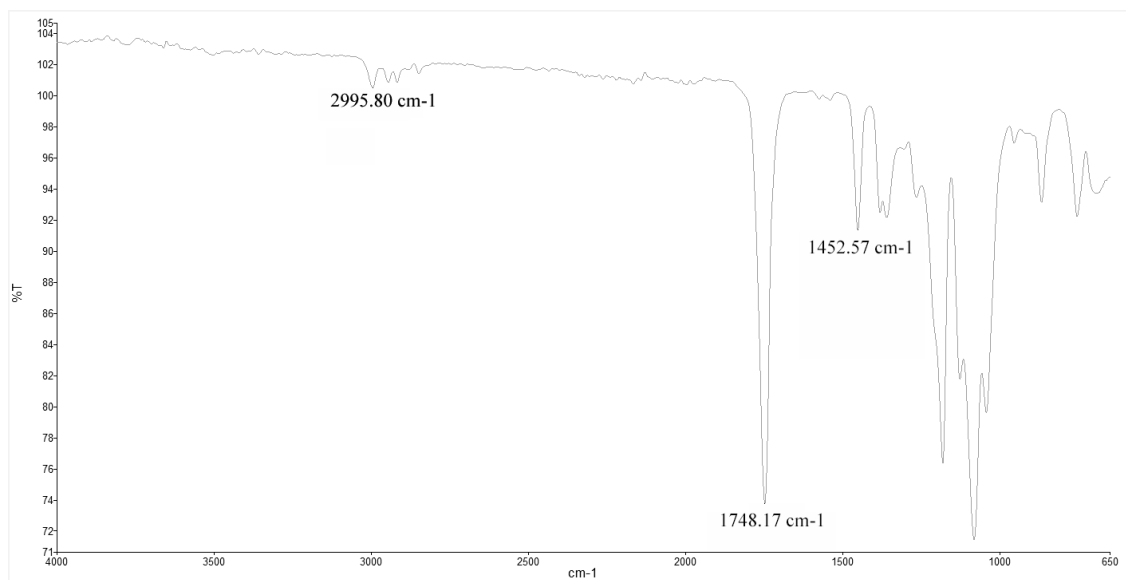


FIG. 8B

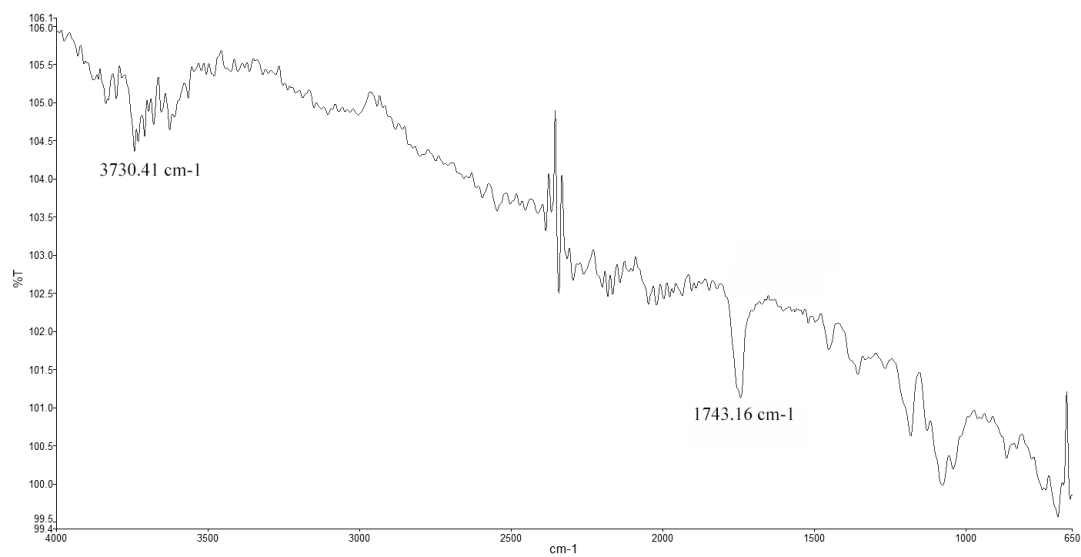


FIG. 9A

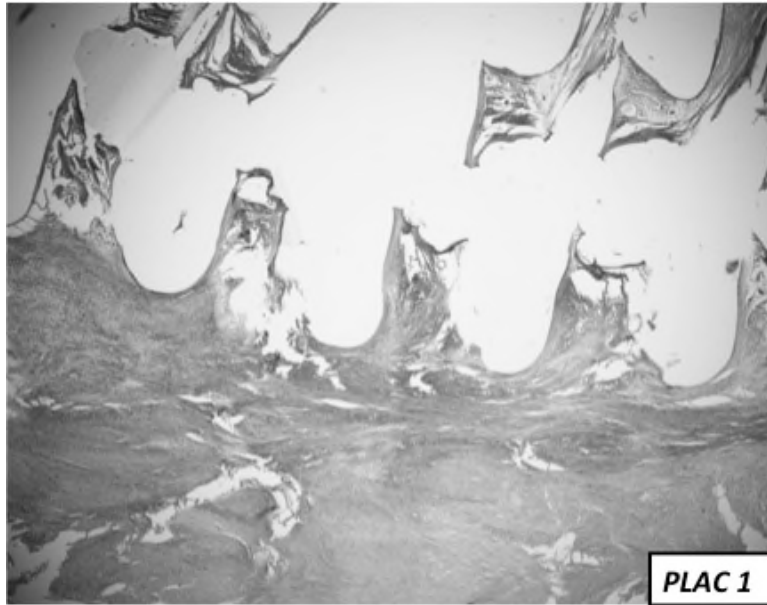
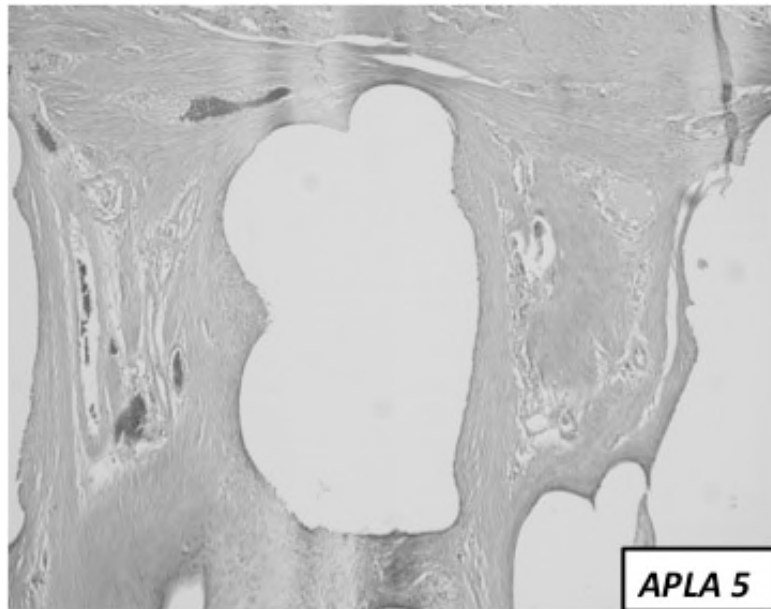


FIG. 9B





- ②① N.º solicitud: 202031200
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2020
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61L27/44** (2006.01)
A61L27/50 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ROSER SABATER I SERRA <i>et al.</i> Bio-Nanocomposite Hydrogel Based on ZincAlginate/Graphene Oxide: Morphology, Structural Conformation, Thermal Behavior/Degradation, and Dielectric Properties. <i>Polymers</i> , 01/03/2020, Vol. 12, Páginas 1-16, ISSN 2073-4360, <DOI: doi:10.3390/polym12030702>. resumen; página 1; página 2, segundo y tercer párrafo; página 3, primer, tercer y cuarto párrafo; página 6, primer párrafo.	1-13
A	EDWARD J. CATERSON <i>et al.</i> Three dimensional cartilage formation by bone marrow derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. <i>Journal of biomedical materials research</i> , 05/12/2001, Vol. 57, Páginas 394-403, ISSN 0021-9304, página 395, columna derecha, tercer párrafo; página 396, columna izquierda, primer párrafo.	1-13
A	WAYNE J S <i>et al.</i> <i>In vivo</i> response of polylactic acid –Alginate scaffolds and Bone Marrow derived cells for cartilage tissue engineering, <i>Tissue Engineering</i> , mayo 2005, Vol. 11, Páginas 953-963, ISSN 1076-3279. página 954, columna izquierda, tercer párrafo; página 954, columna derecha, cuarto párrafo; página 955, columna izquierda, primer párrafo.	1-13
A	NARAYANAN LOKESH KARTHIK <i>et al.</i> 3D bioprinting of polylactic acid (PLA) nanofibers-Alginate hidrogel bioink containing human adipose derived stem cells. <i>ACS Biomaterials Science & Engineering</i> , 06/07/2016, Vol. 2, Páginas 1-39, ISSN 2373-9878, <DOI: DOI: 10.1021/acsbomaterials.6b00196>. página 5, líneas 36-40; página 7, líneas 8-32; página 8, líneas 3-19; página 11.	1-13
A	PLACE ELSIE <i>et al.</i> Strontium and zinc-alginate hydrogels for bone tissue engineering. <i>Tissue Engineering Part A</i> , noviembre 2011, Vol. 17, Nº 21-22, Páginas 2713-2722, ISSN 1937-3341, <DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0059>. página 2713, columna izquierda, último párrafo-columna derecha, primer párrafo; página 2713, columna derecha, tercer párrafo; página 2714, columna izquierda, primer, segundo y tercer párrafo.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.10.2021

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/3



- ① N.º solicitud: 202031200
② Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2020
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61L27/44** (2006.01)
A61L27/50 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BUONG WOEI CHIENG <i>et al.</i> Effects of Graphene Nanoplatelets and Reduced Graphene Oxide on Poly(lactic acid) and Plasticized Poly(lactic acid): A Comparative Study.. Polymers, 21/08/2014, Vol. 6, Páginas 2232-2246, Recuperado de Internet <URL: www.mdpi.com/journal/polymers>, ISSN 2073-4360. resumen; página 2234, tercer párrafo.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
29.10.2021

Examinador
S. González Peñalba

Página
2/3

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET.