

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 104**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2018 PCT/EP2018/050877**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2018 WO18130686**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2018 E 18700301 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.06.2021 EP 3568166**

54 Título: **Material de regeneración ósea**

30 Prioridad:

16.01.2017 BE 175025

16.01.2017 WO PCT/EP2017/050779

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2021

73 Titular/es:

WISHBONE (100.0%)

**Rue de l'Expansion 1 Boîte 3
4400 Flemalle5, BE**

72 Inventor/es:

**DORY, EMILIE;
ROMPEN, ERIC;
LAMBERT, FRANCE y
LECLOUX, GEOFFREY**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 885 104 T3

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

DESCRIPCIÓN

Material de regeneración ósea

5 La presente invención se refiere a un material de regeneración ósea, que comprende una primera fase sólida de hidroxiapatita macroporosa de origen natural que presenta poros de diámetros superiores o iguales a 50 μm , preferiblemente poros de diámetros comprendidos entre 50 y 100 μm .

10 Un material de regeneración ósea de este tipo se conoce a partir del documento WO2015/049336 y se usa en el contexto del tratamiento de deterioros óseos en diferentes campos tales como la cirugía reparadora o estética.

15 La hidroxiapatita es una especie mineral de la familia de los fosfatos, de fórmula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Más específicamente, la hidroxiapatita pertenece a la familia cristalográfica de las apatitas que son compuestos isomorfos que presentan una misma estructura hexagonal. Este compuesto se usa ampliamente como biomaterial desde hace varios años en diferentes especialidades médicas dado que las hidroxiapatitas son los fosfatos de calcio cristalinos más frecuentes y los principales constituyentes minerales de los huesos, del esmalte dental y de la dentina. Por otro lado, las hidroxiapatitas (y, en particular, las hidroxiapatitas de origen natural) presentan buenas propiedades de biocompatibilidad y de adsorción específica de las células o de las proteínas.

20 Por tanto, se reconoce que la hidroxiapatita de origen natural presenta propiedades osteoconductoras así como una estructura cristalina y una morfología idénticas a las de un material óseo natural en el ser humano, siendo por tanto la hidroxiapatita perfectamente conveniente en el contexto de una cirugía reconstructora o reparadora de los huesos. En este sentido, actualmente se usan numerosos materiales que comprenden hidroxiapatita como implantes dentales para estimular la reconstrucción ósea en sitios óseos que presentan defectos o deterioros. En particular, el uso de una hidroxiapatita natural procedente de muestras óseas de las que se han retirado sus sustancias orgánicas (proteínas, priones, péptidos y lípidos), permite obtener una matriz particularmente propicia para la regeneración ósea en comparación con su análogo artificial. Es preferible que el material de regeneración ósea se depure previamente de cualquier traza de sustancias orgánicas de manera que el organismo acepte/integre bien el implante, y que éste sea biocompatible y pueda interactuar mediante osteoconducción con el entorno biológico en el que se coloca.

35 Como ejemplo, las hidroxiapatitas pueden servir de materiales de sustitución para la sustitución o la regeneración de tejidos enfermos o dañados. También se usan frecuentemente como revestimiento (“*coating*”) sobre prótesis de titanio para facilitar la osteointegración o incluso para impedir el desgaste debido a micromovimientos entre el implante y el hueso. Las hidroxiapatitas también pueden usarse como cemento con el fin de sustituir los injertos óseos autógenos. Además, cada vez se desarrollan más aplicaciones de la hidroxiapatita como vector de medicamentos, dado que la hidroxiapatita presenta una estructura con microporos interconectados.

40 Tal como se mencionó anteriormente, la hidroxiapatita presenta una composición química muy parecida a la de la fase mineral de los huesos y sus propiedades biológicas así como su biocompatibilidad hacen que sea un excelente producto de sustitución ósea. Se precisa que una colonización ósea depende de las características porosas del material de regeneración ósea y de la interconexión entre sus macroporos (número y dimensión). Estas interconexiones constituyen especies de “túneles” que permiten el paso de las células y la circulación sanguínea entre los poros favoreciendo de este modo la formación ósea.

45 La hidroxiapatita, debido a su alto nivel de biocompatibilidad y a su lenta resorción en el organismo, puede administrarse en diferentes formas y en numerosos tejidos para diversas aplicaciones. Se distinguen concretamente cementos maleables a base de hidroxiapatita que se preparan y después se administran en la zona que va a tratarse en donde se endurecen. Estos cementos se usan como sustituto óseo debido a su buena osteointegración y a su capacidad de biorresorción que permiten dejar lugar a un hueso recién formado a lo largo del tiempo.

50 También existen disoluciones y geles a base de hidroxiapatita que pueden contener un polímero tal como carboximetilcelulosa. Entonces se habla de implantes compuestos de cerámica-polímero bioactivos, pudiendo usarse estos productos en diferentes campos tales como para rellenar defectos parodontales en cirugía dental o actuar como relleno en cirugía ortopédica.

Determinados productos a base de hidroxiapatita se presentan además en forma de bloque, de polvo o de gránulos usados en ortopedia, como relleno o como complemento de los implantes dentales.

60 Entre los productos a base de hidroxiapatita, son muchos los que no están listos para emplearse y necesitan una preparación previa. Este es concretamente el caso de los cementos a base de hidroxiapatita, que requieren una mezcla previa de un polvo y una solución antes de depositarse sobre o en una zona a tratar, en donde después se produce el endurecimiento *in situ*. Otros productos a base de hidroxiapatita necesitan además conformarse antes de la implantación sobre o en la zona que va a tratarse.

65

Desgraciadamente, aunque un material de regeneración ósea de este tipo, que comprende una fase sólida de hidroxiapatita macroporosa de origen natural, presenta propiedades propicias para una implantación endoósea y permite una regeneración ósea correcta gracias a su biocompatibilidad y a sus capacidades osteoconductoras, en la práctica se observa que este tipo de material de regeneración ósea no siempre es óptimo y que el plazo del proceso de regeneración ósea siempre es relativamente prolongado (1 mm/mes). Por otro lado, frecuentemente la cantidad de regeneración ósea es insuficiente, lo que genera la formación de fibrosis parciales en vez de una osificación total.

Con el objetivo de acelerar el proceso de regeneración ósea, el documento US2002/0114755 divulga un material que comprende hidroxiapatita y del 50 al 90 % en masa de fosfato tricálcico, obteniéndose el material, según este documento anterior, mediante conversión de tejidos de algas duras en una solución acuosa de fosfato con la adición de iones Mg^{++} a temperatura elevada.

El material de regeneración ósea según este documento anterior, es decir, que comprende hidroxiapatita y del 50 al 90 % en masa de fosfato tricálcico de origen natural, presenta una estructura porosa interconectada, una resorción mejorada y controlable en el organismo conduciendo a una regeneración ósea acelerada.

Desgraciadamente, aunque un material de regeneración ósea según el documento US2002/0114755 permite acelerar el proceso de regeneración ósea aumentando el aporte de calcio y de fósforo en forma de iones libres en el entorno directo del sitio de implantación, se observa que este tipo de material no es óptimo.

En efecto, el procedimiento de obtención de un material de regeneración ósea de este tipo consiste en la transformación de hidroxiapatita en fosfato tricálcico. Por tanto, se trata de la conversión de una primera fase natural en una segunda fase natural, reemplazándose la hidroxiapatita por el fosfato tricálcico.

Por tanto, durante la implantación del material de regeneración ósea según el documento US2002/0114755, el fosfato tricálcico que es más soluble que la hidroxiapatita va a solubilizarse rápidamente y liberar iones de calcio y fósforo en el entorno del sitio de implantación. Tal como se mencionó anteriormente, el fosfato tricálcico de un material de regeneración ósea de este tipo, representa del 50 al 90 % en masa y se obtiene mediante la conversión de una parte de la hidroxiapatita contenida en el material de partida, es decir, tejido de algas duras. Por consiguiente, con un material de regeneración ósea según este documento anterior, del 50 al 90 % de la masa (correspondiente al fosfato tricálcico) va a solubilizarse rápidamente tras la implantación y conducir por tanto a un material de hidroxiapatita natural que presenta grandes zonas vacías y, por tanto, a un material de hidroxiapatita que es ciertamente de origen natural pero que ya no presenta las características topográficas (porosidad, superficie específica,...) óptimas que permiten una buena regeneración ósea.

Por tanto, un material de regeneración ósea según el documento US2002/0114755, no permite mantener a largo plazo la estructura microporosa adecuada de la hidroxiapatita natural una vez implantada y por tanto no permite garantizar un proceso de regeneración ósea óptimo en el sitio de implantación en cuanto a la proliferación y diferenciación de las células óseas dado que un material de este tipo, una vez implantado, no presenta una topografía de superficie ni una microporosidad adecuadas.

El documento EP 0278583A2 describe un material de remplazo óseo que comprende hidroxiapatita procedente de hueso natural, que tiene poros de diámetro comprendido entre 5 y 500 μm . El material comprende dos fases, de las cuales una tiene una razón molar Ca/P comprendida entre 1,0 y 2,0. La segunda fase comprende fosfato tetracálcico. El documento también describe un procedimiento de fabricación que consiste en sumergir el hueso natural en una solución de fósforo o en una solución que comprende calcio, seguido de una etapa de sinterización.

La invención tiene como objetivo paliar los inconvenientes del estado de la técnica proporcionando un material de regeneración ósea que permita minimizar el tiempo de regeneración ósea al tiempo que estimule el potencial de regeneración ósea de tal manera que se obtenga una cantidad de hueso regenerado óptima.

El material de regeneración ósea según la invención no solo presenta propiedades químicas (liberación optimizada de calcio y de fósforo en forma de iones libres) que permiten minimizar el tiempo de regeneración ósea, sino que también presenta propiedades físicas (topografía y porosidad conservadas) óptimas que permiten una buena colonización ósea de tal manera que se obtiene una cantidad de hueso regenerado óptima.

Para resolver este problema, según la invención, se proporciona un material de regeneración ósea que comprende una primera fase sólida de hidroxiapatita macroporosa de origen natural que presenta poros de diámetros superiores o iguales a 50 μm , preferiblemente poros de diámetros comprendidos entre 50 y 100 μm , estando dicho material de regeneración ósea caracterizado por que dicha primera fase sólida de hidroxiapatita está enriquecida mediante una segunda fase de fosfato de calcio, siendo dicha segunda fase una fase sintética sólida, que presenta una razón molar Ca/P comprendida entre 0,2 y 2, preferiblemente comprendida entre 0,3 y 1,8, preferiblemente comprendida entre 0,5 y 1,65, y que presenta un producto de solubilidad K_s superior al de dicha primera fase de hidroxiapatita de origen natural, presentando dicho material de regeneración ósea una razón en peso definida entre dicha primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural y dicha segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio comprendida entre 99/1 y 1/99.

Ventajosamente, según la invención, la razón en peso definida entre dicha primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural y dicha segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio es de 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, 65/35, 60/40, 55/45, 50/50, 45/55, 40/60, 35/65, 30/70, 25/75, 20/80, 15/85, 10/90 o 5/95.

En el contexto de la presente invención, se ha demostrado que un material de regeneración ósea de este tipo según la invención que presenta:

- una primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural que presenta poros de diámetros superiores o iguales a 50 μm , preferiblemente poros de diámetros comprendidos entre 50 y 100 μm ;
- una segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio destinada a enriquecer dicha primera fase;
- una razón molar Ca/P para la segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio comprendida entre 0,2 y 2, preferiblemente comprendida entre 0,3 y 1,8, preferiblemente comprendida entre 0,5 y 1,65 y que presenta un producto de solubilidad Ks superior al de dicha primera fase de hidroxiapatita de origen natural; y
- una razón en peso definida entre dicha primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural y dicha segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio comprendida entre 99/1 y 1/99,

permite garantizar una liberación adecuada de calcio (por ejemplo, en forma de iones libres extracelulares Ca^{2+}) y fósforo (por ejemplo, en forma de iones libres extracelulares PO_4^{3-}) en el entorno del sitio de regeneración ósea de tal manera que pueden desempeñar el papel de promotores del crecimiento de tejidos biológicos circundantes favoreciendo significativamente la proliferación y la diferenciación de las células óseas así como la mineralización.

Además, se ha observado de manera sorprendente que el material de regeneración ósea según la invención, es decir, cuya fase sólida de hidroxiapatita es una fase de hidroxiapatita natural que está enriquecida mediante una segunda fase de fosfato de calcio, presenta características topográficas (porosidad, superficie específica, ...) óptimas que permiten optimizar la regeneración ósea permitiendo una buena colonización ósea, y esto incluso después de la implantación del material de regeneración ósea.

Una buena colonización ósea depende de las características porosas del material de regeneración ósea y de la interconexión entre sus macroporos (número y dimensiones), constituyendo estas interconexiones especies de "túneles" que permiten el paso de las células y la circulación sanguínea entre los poros favoreciendo la formación ósea. Por tanto, la conservación de las características topográficas de la hidroxiapatita natural es crucial para obtener una regeneración ósea adecuada, lo cual no sucede con un material de regeneración según el documento US2002/0114755 en donde una parte (del 50 al 90 % en masa) de la fase natural de hidroxiapatita, se convierte en una fase natural de fosfato tricálcico.

Por tanto, un material de regeneración ósea según la invención presenta a la vez propiedades químicas y físicas óptimas (liberación optimizada de calcio y de fósforo en forma de iones libres / topografía, porosidad) que garantizan una regeneración ósea y una formación del hueso optimizadas en un tiempo significativamente reducido con respecto a un material de regeneración ósea tal como el de los documentos WO2015/049336 y US2002/0114755.

En particular, en el contexto de la presente invención, se ha demostrado que, cuando la razón en peso definida entre dicha primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural y dicha segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio está comprendida entre 99/1 y 1/99, y preferiblemente es de 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, 65/35, 60/40, 55/45, 50/50, 45/55, 40/60, 35/65, 30/70, 25/75, 20/80, 15/85, 10/90 o 5/95, el tiempo de regeneración ósea se reduce significativamente. Esto se debe al hecho de que, con una razón de este tipo, al menos una de las liberaciones de calcio y/o de fósforo en forma de iones libres es de tal manera que el calcio y/o el fósforo se encuentra entonces en el medio circundante de regeneración ósea en una cantidad que permite aumentar significativamente la concentración con respecto a la concentración que se encuentra de manera natural, mientras que la hidroxiapatita sola tiene tendencia a capturar el calcio y el fósforo en forma de iones libres y a agotarlos en el medio circundante del sitio de regeneración ósea.

Se observa que, en el estado de la técnica, se describen materiales de regeneración ósea bifásicos, en particular, materiales que consisten en una asociación de hidroxiapatita sintética y de fosfato de calcio tricálcico sintético: se trata por tanto de materiales sintéticos al 100 % que, como para un material de regeneración tal como se indicó al principio, imponen una duración de regeneración ósea relativamente prolongada. Por otro lado, a diferencia de un material según la invención, tales materiales de regeneración ósea bifásicos totalmente sintéticos, no permiten garantizar una regeneración ósea óptima en el sitio de implantación en cuanto a la proliferación y diferenciación de las células óseas dado que no presentan una topografía de superficie ni una microporosidad adecuadas.

Preferiblemente, según la invención, dicha segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio presenta un producto de solubilidad Ks superior al de dicha primera fase de hidroxiapatita de origen natural. Esto es particularmente ventajoso ya que conviene aportar calcio y fósforo en forma de iones libres en el entorno directo del sitio de

5 implantación al tiempo que se conservan las propiedades estructurales (tamaño de poros, superficie específica, ...) y de composición de la fase sólida de hidroxiapatita de origen natural. Dado que la solubilidad de la segunda fase es superior, es esencialmente esta fase en particular la que va a originar la liberación de calcio y de fósforo en forma de iones libres (por ejemplo, Ca^{2+} y PO_4^{3-}) y no la hidroxiapatita de origen natural que se disuelve netamente menos y que, por el contrario, tiene tendencia a fijar estos iones a partir del entorno de implantación.

Ventajosamente, según la invención, dicha primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural presenta una superficie específica superior a $4 \text{ m}^2/\text{g}$.

10 Preferiblemente, según la invención, dicha segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio se elige del grupo constituido por fosfato de calcio monocálcico (MCP), fosfato de calcio bicálcico (DCP), fosfato octacálcico (OCP), apatita deficiente en calcio (CDA), fosfato de calcio amorfo (ACP), fosfato de calcio tricálcico (TCP), fosfato de calcio tetracálcico (TTCP) y sus mezclas.

15 Ventajosamente, según la invención, dicha primera fase de hidroxiapatita de origen natural es hidroxiapatita obtenida a partir de un material óseo de origen natural, en particular a partir de un material óseo de origen animal. Por ejemplo, la hidroxiapatita de origen natural puede ser hidroxiapatita obtenida a partir de un material óseo procedente de un mamífero (bovino, caballo, cerdo u oveja), de coral o de material seco.

20 De manera preferida, según la invención, dicha hidroxiapatita macroporosa de origen natural de dicha primera fase, es una hidroxiapatita macroporosa de origen natural al menos parcialmente sinterizada. La sinterización controlada (calentamiento de un polvo sin llevarlo a la fusión) permite ventajosamente obtener una hidroxiapatita de origen natural que presenta propiedades aumentadas de resistencia mecánica al tiempo que se conserva una microporosidad y una topografía de superficie adecuadas, lo que permite facilitar la implantación y mejorar la estabilidad a largo plazo tras la implantación.

25 Ventajosamente, el material de regeneración ósea según la invención comprende además al menos un agente terapéutico elegido del grupo constituido por antibióticos, antivirales, antiinflamatorios, hormonas tales como esteroides, factores de crecimiento tales como BMP ("*Bone Morphogenetic Protein*", proteínas morfogenéticas óseas), agentes antirrechazo, células madre y sus mezclas.

30 Preferiblemente, el material de regeneración ósea según la invención está destinado a usarse como implante o prótesis para una formación de hueso, una regeneración de hueso o para una reparación de hueso en un mamífero, preferiblemente en un ser humano.

35 Otras realizaciones de un material de regeneración ósea según la invención se indican en las reivindicaciones adjuntas.

40 La invención también tiene como objeto un dispositivo médico que contiene un material de regeneración ósea según la invención.

Otras realizaciones de un dispositivo médico según la invención se indican en las reivindicaciones adjuntas.

45 La invención también tiene como objeto una composición de regeneración ósea que comprende un material de regeneración ósea según la invención.

Otras realizaciones de una composición según la invención se indican en las reivindicaciones adjuntas.

50 La presente invención también se refiere a un procedimiento de enriquecimiento de un material de regeneración ósea según la invención, comprendiendo dicho procedimiento:

- una etapa de suministro de un material de regeneración ósea, y
- una etapa de enriquecimiento de dicho material de regeneración ósea con calcio y con fósforo,

55 estando dicho procedimiento caracterizado por que dicha etapa de enriquecimiento con calcio y con fósforo se realiza mediante al menos una primera y al menos una segunda inmersión distintas que se suceden mutuamente en cualquier orden, teniendo lugar dicha al menos una primera inmersión en una primera solución que comprende calcio y teniendo lugar dicha al menos una segunda inmersión en una segunda solución que comprende fósforo.

60 Preferiblemente, de acuerdo con el procedimiento según la invención, dicha primera inmersión tiene lugar en una primera solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o de CaCO_3 .

65 Ventajosamente, de acuerdo con el procedimiento según la invención, dicha segunda inmersión tiene lugar en una segunda solución de Na_3PO_4 , de Na_2HPO_4 , de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, de K_3PO_4 , de K_2HPO_4 , de KH_2PO_4 , de K_2HPO_4 , de $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ o de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Otras realizaciones de un procedimiento de acuerdo con la invención se indican en las reivindicaciones adjuntas.

5 Otras características, detalles y ventajas de la invención se desprenderán de la descripción facilitada a continuación, a título no limitativo y haciendo referencia a las figuras adjuntas.

10 Las figuras 1a, 1b y 1c ilustran, respectivamente, la evolución de la concentración de calcio (Ca) a lo largo del tiempo para una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino no enriquecida sumergida en un medio HBSS, la evolución de la concentración de fósforo (P) a lo largo del tiempo para una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino no enriquecida sumergida en un medio HBSS y el aumento de peso a lo largo del tiempo para una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino no enriquecida sumergida en un medio HBSS.

15 Las figuras 2a, 2b y 2c ilustran, respectivamente, la evolución de la concentración de calcio (Ca) a lo largo del tiempo para un material sumergido en un medio HBSS y que comprende una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 90/10), la evolución de la concentración de fósforo (P) a lo largo del tiempo para un material sumergido en un medio HBSS y que comprende una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 90/10) y el aumento de peso para un material sumergido en un medio HBSS y que comprende una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 90/10).

20 Las figuras 3a, 3b y 3c ilustran, respectivamente, la evolución de la concentración de calcio (Ca) a lo largo del tiempo para un material sumergido en un medio HBSS y que comprende una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 80/20), la evolución de la concentración de fósforo (P) a lo largo del tiempo para un material sumergido en un medio HBSS y que comprende una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 80/20) y el aumento de peso para un material sumergido en un medio HBSS y que comprende una fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 80/20).

30 Ejemplos

35 Comparaciones de las liberaciones de calcio y de fósforo en forma de iones libres a lo largo del tiempo para diferentes materiales de regeneración ósea – pruebas de solubilidad

Se realizaron ensayos comparativos con el fin de determinar las cantidades (concentraciones) de calcio y de fósforo liberadas a lo largo del tiempo (pruebas de solubilidad) a partir de diferentes materiales de regeneración ósea, esto en un medio que reproduce las condiciones de implantación *in vivo*.

40 1. Metodología

Para ello, se midieron las tasas y las cantidades (concentraciones) de calcio y de fósforo liberadas en un medio que simulaba las condiciones de implantación *in vivo* (plasma sanguíneo humano), es decir, en un medio HBSS (medio salino equilibrado de Hank) que presentaba un pH de 7 y cuya composición se presenta en la tabla 1 a continuación:

45 Tabla 1

	Concentraciones (mM)
Na ⁺	142,8
K ⁺	5,8
Mg ²⁺	0,9
Ca ²⁺	1,3
Cl ⁻	146,8
HCO ³⁻	4,2
HPO ₄ ²⁻	0,3
H ₂ PO ₄ ⁴⁻	0,4
SO ₄ ²⁻	0,4
Glucosa	5,6

50 Se sometieron a prueba los siguientes materiales de regeneración ósea:

- Material 1: 0,5 g de fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino no enriquecida que presenta poros de un tamaño comprendido entre 50 y 100 µm;

- Material 2: 0,5 g de fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino que presenta poros de un tamaño comprendido entre 50 y 100 μm y enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio según una razón en peso fase sólida de hidroxiapatita / fase sintética sólida de fosfato de calcio de 90/10, presentando la fase de fosfato de calcio una razón molar Ca/P inferior a 1,67; y

- Material 3: 0,5 g de fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino que presenta poros de un tamaño comprendido entre 50 y 100 μm y enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio según una razón en peso fase sólida de hidroxiapatita / fase sintética sólida de fosfato de calcio de 80/20, presentando la fase de fosfato de calcio una razón molar Ca/P inferior a 1,67.

La fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino se obtiene según el procedimiento descrito en el documento WO2015/049336 y, más particularmente, está compuesta por partículas de hidroxiapatita que presentan un tamaño comprendido entre 0,25 mm y 1 mm.

Los materiales que comprenden una primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural y una segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio, se obtuvieron mediante inmersiones sucesivas y alternas de una duración de 5 minutos de la primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural (partículas de hidroxiapatita) en distintos baños de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1M, pH=10) y de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5M, pH=10). El primer baño permite enriquecer las partículas de hidroxiapatita de origen natural con calcio (Ca^{2+}), el segundo baño con fósforo (PO_4^{3-}).

Después de 4 inmersiones sucesivas (2 inmersiones en cada baño) para obtener una razón en peso fase sólida de hidroxiapatita / fase sintética sólida de fosfato de calcio de 90/10 o después de 6 inmersiones sucesivas (3 inmersiones en cada baño) para obtener una razón en peso fase sólida de hidroxiapatita / fase sintética sólida de fosfato de calcio de 80/20, se aclararon las partículas de hidroxiapatita de origen natural enriquecidas con calcio y con fósforo con el fin de eliminar los excesos de calcio y de fósforo y después se secaron a una temperatura de 100 °C durante 6 horas.

Se sometieron a prueba simultáneamente un total de 36 muestras (de 0,5 g) mediante inmersión en 10 ml de medio HBSS a una temperatura de 37 °C. Se realizaron mediciones de liberación de calcio y de fósforo en forma de iones libres después de 8 h, 24 h, 48 h, 1 semana, 2 semanas y 3 semanas en dos muestras para cada material y tiempo, aclarándose estas muestras y secándose a una temperatura de 100 °C después de cada uno de estos tiempos.

Las cantidades (concentraciones) de calcio y de fósforo liberadas por cada muestra en el medio HBSS se midieron según la técnica de ICP-AES (*“Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy”*, espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado por inducción), esto tras una eliminación de las eventuales materias en suspensión en el medio HBSS mediante centrifugación. Los pesos de los materiales se definieron por pesaje (gravimétrico) antes y después de la inmersión en el medio HBSS, esto para cada uno de los tiempos mencionados anteriormente.

2. Resultados

Los resultados obtenidos se ilustran en las figuras 1 a 3. Para cada uno de los materiales (muestras), las concentraciones de partida de calcio y de fósforo son, respectivamente, de 1,26 mmol/l y de 0,78 mmol/l, lo que corresponde a las concentraciones de estos iones en el medio HBSS inicial.

Estos resultados muestran que, cuando se sumerge el material 1 (fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino no enriquecida) en el medio HBSS, las concentraciones de calcio y de fósforo en forma de iones libres disminuyen antes de estabilizarse (figuras 1a y 1b). En paralelo, se observa un aumento del peso del material 1 (figura 1c). Por ejemplo, después de 3 semanas, la concentración de calcio en el medio es de 0,06 mmol/l mientras que la concentración de fósforo en el medio es de 0,03 mmol/l, con un aumento de peso medio por muestra 5 mg.

Para el material 2 (fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 90/10)) las concentraciones de calcio y de fósforo comienzan a disminuir con una rápida estabilización de la concentración de calcio (0,6 mmol/l) mientras que la concentración de fósforo aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor final de 1,34 mmol/l después de 3 semanas de inmersión (figuras 2a y 2b), siendo esta concentración superior a la concentración inicial de fósforo en el medio HBSS. Los pesos de las muestras del material 2 aumentaron primero un poco antes de disminuir hasta una pérdida de peso de 3,5 mg (figura 2c).

Con respecto al material 3 (fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 80/20)), las concentraciones de calcio y de fósforo aumentan a lo largo del tiempo mientras que el peso de las muestras disminuye (figuras 3a a 3c). Las concentraciones finales de calcio y de fósforo, después de 3 semanas de inmersión en el medio HBSS, son de 3,69 mmol/l y de 2,78 mmol/l,

respectivamente, con una pérdida de peso de 12,5 mg, siendo estas concentraciones superiores a las medidas inicialmente en el medio HBSS.

3. Conclusión

5 Los resultados obtenidos con el material 1 (fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino no enriquecida) destacan la capacidad de la hidroxiapatita para fijar el calcio y el fósforo en forma de iones libres presentes en el medio HBSS para formar una capa de apatita en su superficie. Ya después de 8 h de inmersión, la mayor parte de los iones libres de calcio y de fósforo se absorben en la superficie de las muestras. Estos resultados concuerdan con los hallazgos gravimétricos que indican que las muestras son más pesadas después de 3 semanas de inmersión. Por tanto, estos resultados indican que el material 1 (hidroxiapatita no enriquecida) fija el calcio y el fósforo en forma de iones libres y que la disolución de la hidroxiapatita en el medio HBSS es despreciable.

15 Estos resultados ponen de manifiesto que, para el material 2 (fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón 90/10)), se producen dos fenómenos de manera simultánea dado que en primer lugar disminuyen las concentraciones de calcio y de fósforo, lo que de nuevo se relaciona con la capacidad que posee la hidroxiapatita para fijar estos iones. Sin embargo, la concentración de fósforo en el medio aumenta entonces e incluso supera la concentración de este compuesto en el medio HBSS inicial, mientras que la concentración de calcio sigue siendo inferior a la medida inicialmente en el medio HBSS, aunque es superior a la medida cuando el material 1 se sumerge en este mismo medio. En paralelo, después de 3 semanas, los resultados gravimétricos muestran que las muestras han perdido peso. El conjunto de estos resultados para el material 2 indican que este material se disuelve en el medio HBSS, lo cual sólo puede atribuirse a la fase de enriquecimiento (fase sintética sólida de fosfato de calcio) dado que los resultados obtenidos con el material 1 muestran que la disolución de la hidroxiapatita en las mismas condiciones es totalmente despreciable.

25 Los resultados obtenidos con el material 3 (fase sólida de hidroxiapatita natural de origen bovino enriquecida mediante una fase sintética sólida de fosfato de calcio (razón de 80/20)) demuestran que no se produce ninguna disminución de las concentraciones de calcio y de fósforo, más bien al contrario, dado que las concentraciones de calcio y de fósforo aumentan a lo largo del tiempo en paralelo con una pérdida de peso de las muestras. A partir de estas observaciones, puede concluirse que estos aumentos de las concentraciones de calcio y de fósforo se deben a una disolución de la segunda fase del material 3 en el medio HBSS dado que los resultados obtenidos con el material 1 muestran que la disolución de la hidroxiapatita en las mismas condiciones es totalmente despreciable. Por otro lado, puede observarse que el material 3 no fija el calcio y el fósforo en forma de iones libres liberados o solamente lo hace de manera despreciable, lo que garantiza que estos últimos permanecen en solución.

35 El conjunto de estos resultados también muestra que el enriquecimiento (fase sintética sólida de fosfato de calcio) es más soluble que la hidroxiapatita y que está en condiciones de liberar calcio y fósforo en forma de iones libres (Ca^{2+} y PO_4^{3-}) en el medio circundante (HBSS imitando el plasma sanguíneo).

REIVINDICACIONES

1. Material de regeneración ósea, que comprende una primera fase sólida de hidroxiapatita macroporosa de origen natural que presenta poros de diámetros superiores o iguales a 50 μm , preferiblemente poros de diámetros comprendidos entre 50 y 100 μm , estando dicho material de regeneración ósea **caracterizado por que** dicha primera fase sólida de hidroxiapatita está enriquecida mediante una segunda fase de fosfato de calcio, siendo dicha segunda fase una fase sintética sólida, que presenta una razón molar Ca/P comprendida entre 0,2 y 2, preferiblemente comprendida entre 0,3 y 1,8, preferiblemente comprendida entre 0,5 y 1,65, y que presenta un producto de solubilidad K_s superior al de dicha primera fase de hidroxiapatita de origen natural, presentando dicho material de regeneración ósea una razón en peso definida entre dicha primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural y dicha segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio comprendida entre 99/1 y 1/99.
2. Material de regeneración ósea según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicha primera fase sólida de hidroxiapatita de origen natural presenta una superficie específica superior a 4 m^2/g .
3. Material de regeneración ósea según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** dicha segunda fase sintética sólida de fosfato de calcio se elige del grupo constituido por fosfato de calcio monocálcico (MCP), fosfato de calcio bicálcico (DCP), fosfato octacálcico (OCP), apatita deficiente en calcio (CDA), fosfato de calcio amorfo (ACP), fosfato de calcio tricálcico (TCP), fosfato de calcio tetracálcico (TTCP) y sus mezclas.
4. Material de regeneración ósea según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha primera fase de hidroxiapatita de origen natural es hidroxiapatita obtenida a partir de un material óseo de origen natural, en particular a partir de un material óseo de origen animal.
5. Material de regeneración ósea según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha hidroxiapatita macroporosa de origen natural de dicha primera fase es una hidroxiapatita macroporosa de origen natural al menos parcialmente sinterizada.
6. Material de regeneración ósea según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos un agente terapéutico elegido del grupo constituido por antibióticos, antivirales, antiinflamatorios, hormonas tales como esteroides, factores de crecimiento tales como BMP ("*Bone Morphogenetic Protein*", proteínas morfogenéticas óseas), agentes antirrechazo, células madre y sus mezclas.
7. Material de regeneración ósea según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, destinado a usarse como implante o prótesis para una formación de hueso, una regeneración de hueso o para una reparación de hueso en un mamífero, preferiblemente en un ser humano.
8. Dispositivo médico que contiene un material de regeneración ósea según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Composición de regeneración ósea que comprende un material de regeneración ósea según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Procedimiento de enriquecimiento de un material de regeneración ósea según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho procedimiento:
 - una etapa de suministro de un material de regeneración ósea, y
 - una etapa de enriquecimiento de dicho material de regeneración ósea con calcio y con fósforo,
 estando dicho procedimiento **caracterizado por que** dicha etapa de enriquecimiento con calcio y con fósforo se realiza mediante al menos una primera y al menos una segunda inmersión distintas que se suceden mutuamente en cualquier orden, teniendo lugar dicha al menos una primera inmersión en una primera solución que comprende calcio y teniendo lugar dicha al menos una segunda inmersión en una segunda solución que comprende fósforo.
11. Procedimiento de enriquecimiento de un material de regeneración ósea según la reivindicación 10, **caracterizado por que** dicha primera inmersión tiene lugar en una primera solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ o de CaCO_3 .
12. Procedimiento de enriquecimiento de un material de regeneración ósea según la reivindicación 10 u 11, **caracterizado por que** dicha segunda inmersión tiene lugar en una segunda solución de Na_3PO_4 , de Na_2HPO_4 , de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, de K_3PO_4 , de K_2HPO_4 , de KH_2PO_4 , de K_2HPO_4 , de $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ o de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

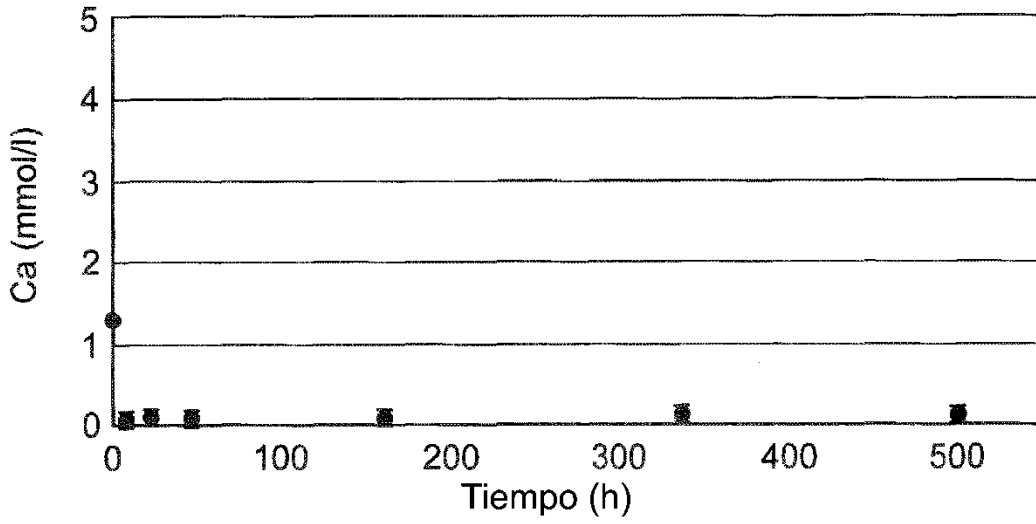


Fig 1a

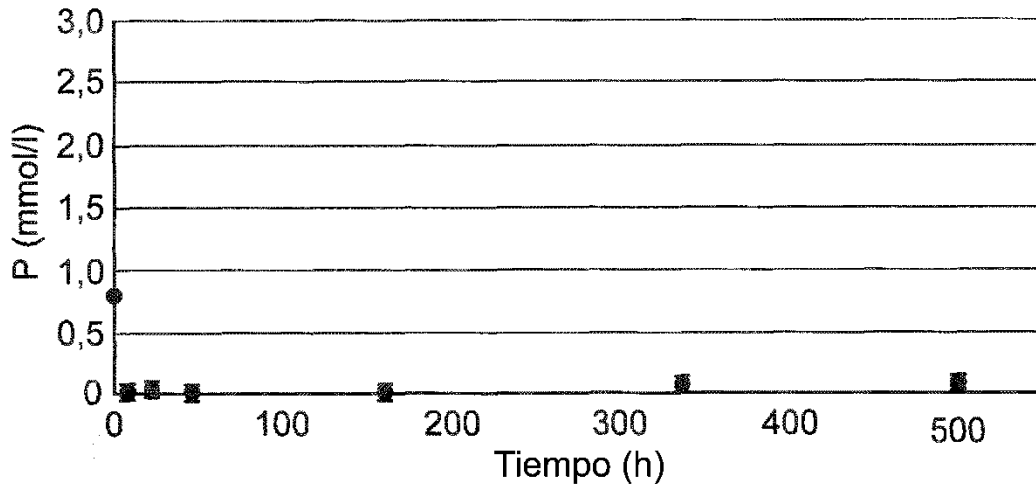


Fig 1b

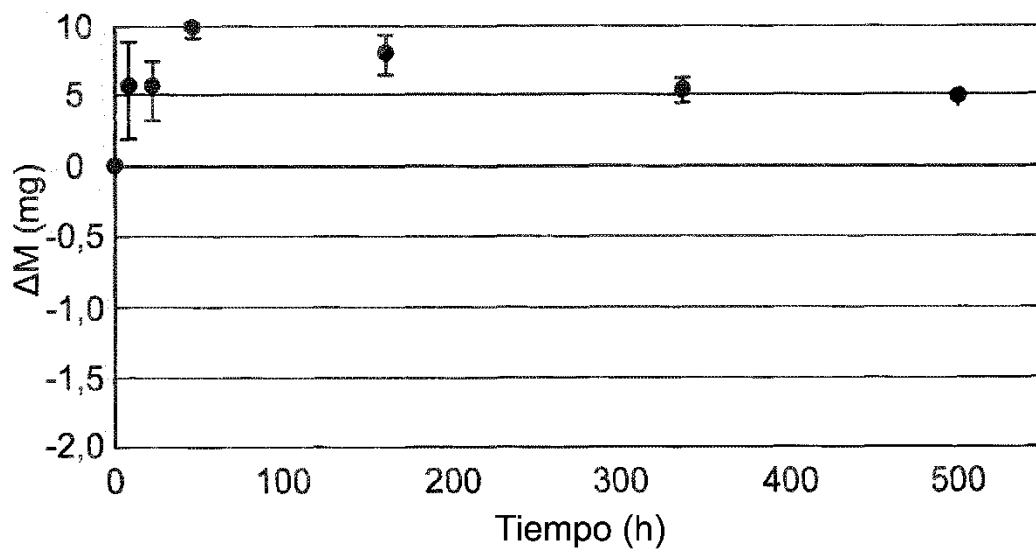


Fig 1c

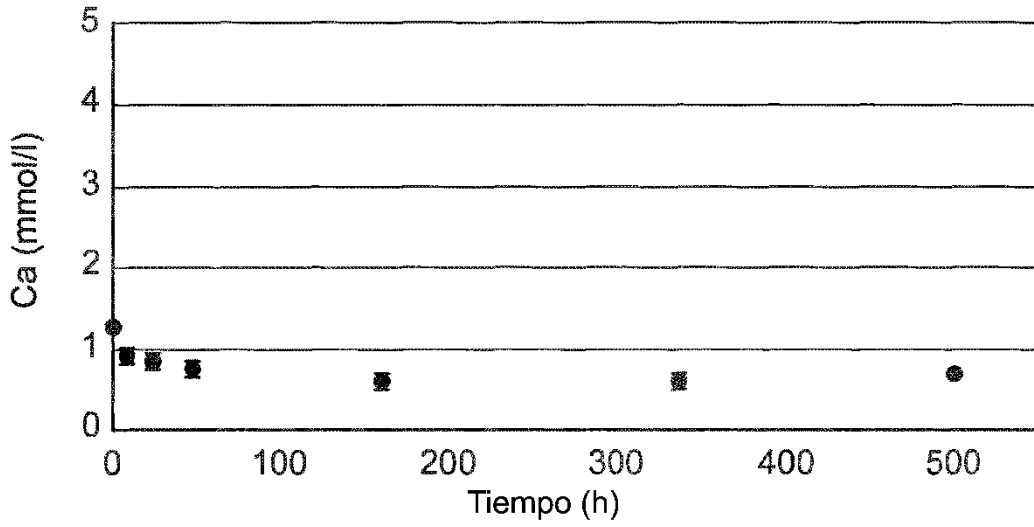


Fig 2a

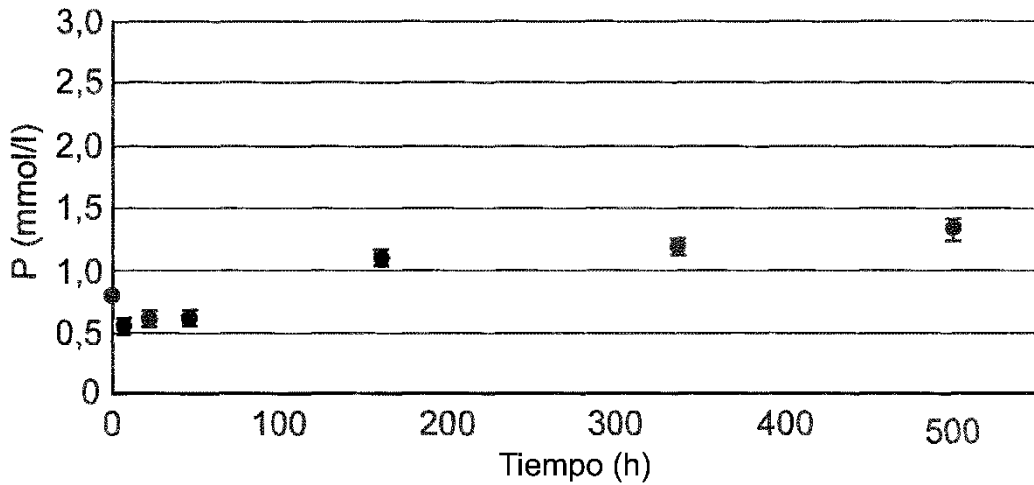


Fig 2b

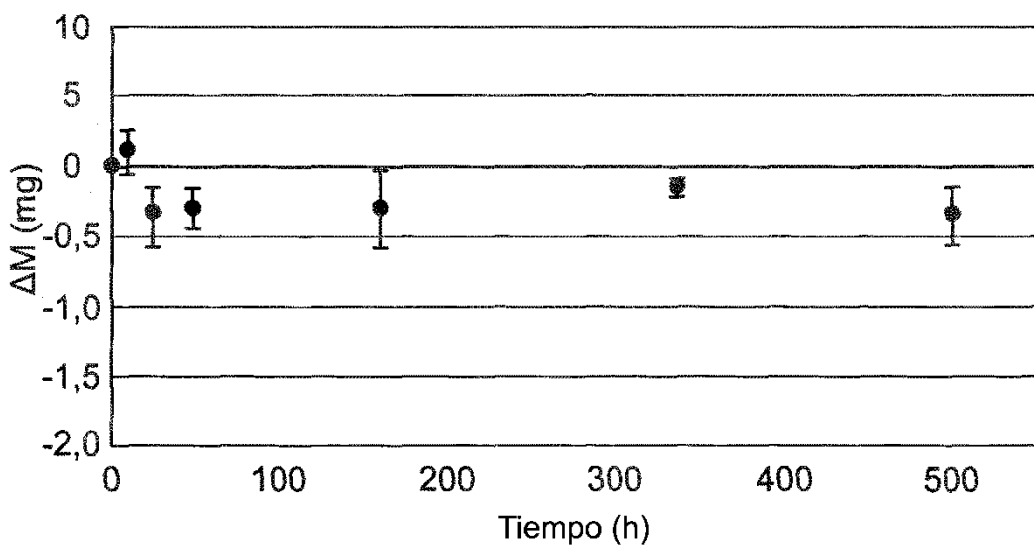


Fig 2c

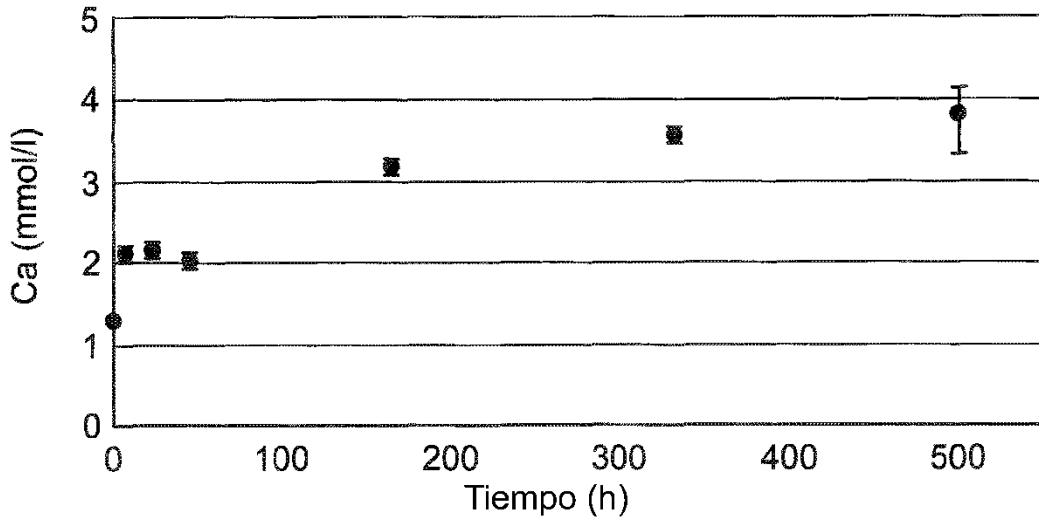


Fig 3a

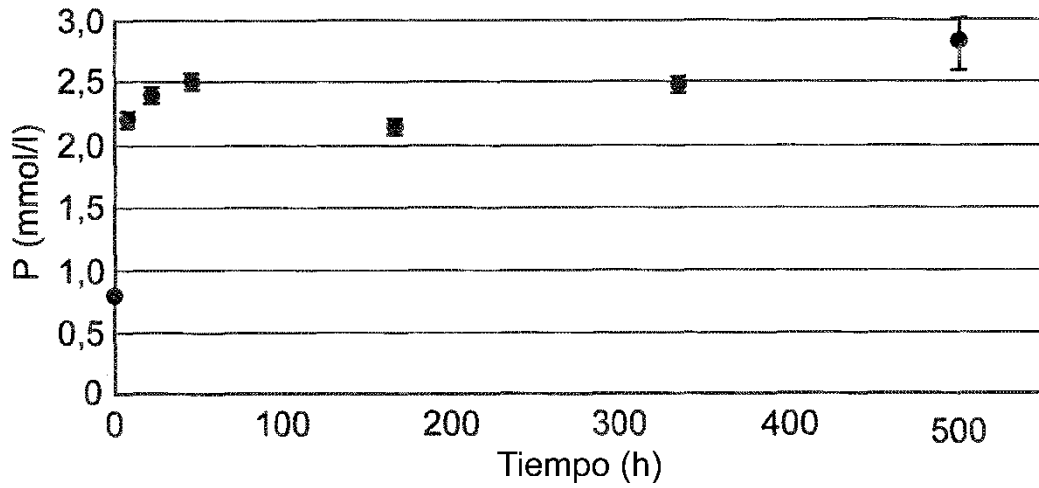


Fig 3b

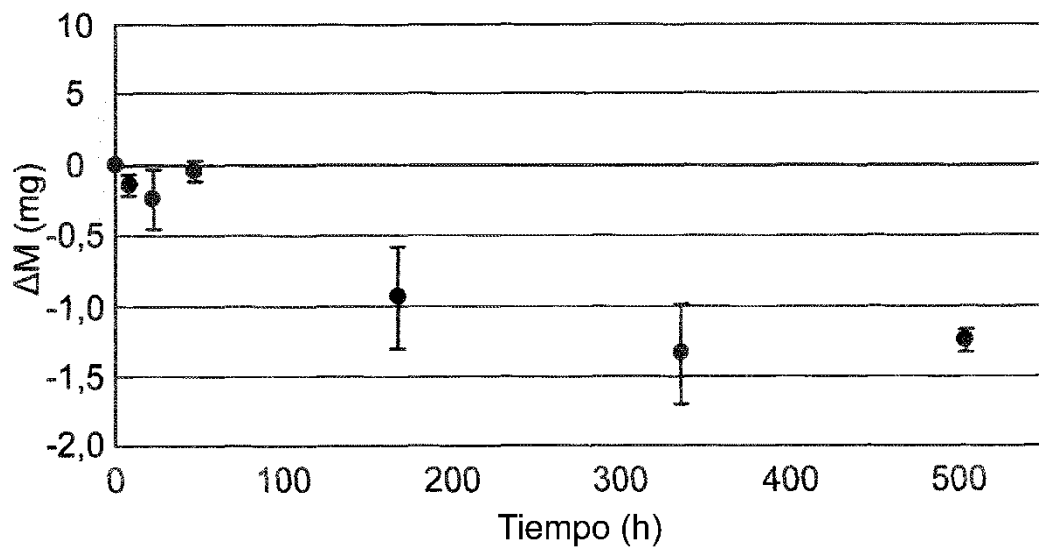


Fig 3c