



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 503**

51 Int. Cl.:

**A61L 24/00** (2006.01)

**A61L 27/46** (2006.01)

**A61L 27/24** (2006.01)

**A61F 2/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04001417 .7**

96 Fecha de presentación : **23.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1447104**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

54 Título: **Procedimiento para sintetizar tejido óseo artificial y su uso.**

30 Prioridad: **05.02.2003 IT MI03A0186**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.03.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.03.2010**

73 Titular/es:  
**CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE**  
**Piazzale Aldo Moro, 7**  
**00185 Roma, IT**

72 Inventor/es: **Tampieri, Anna;**  
**Celotti, Giancarlo;**  
**Roveri, Norberto y**  
**Landi, Elena**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento para sintetizar tejido óseo artificial y su uso.

5 Se sabe que los huesos naturales están hechos de cristales de hidroxiapatita lamelar crecidos en estrecho contacto con fibrillas de colágeno. Las propiedades del tejido óseo artificial difieren ampliamente de las del tejido óseo natural, debiéndose dichas diferencias principalmente a la ausencia de interacciones específicas entre los cristales de hidroxiapatita y los componentes proteicos autoensamblados de los tejidos duros naturales.

10 El colágeno constituye aproximadamente el 30% en peso de la proteína total del cuerpo y proporciona resistencia y estabilidad estructural a los diversos tejidos, desde la piel a los huesos. Ya se han identificado más de 25 subtipos de colágeno, siendo el mejor conocido el tipo I, que es el constituyente principal de los tendones y el tejido óseo. Por otro lado, aproximadamente el 70% en peso del tejido óseo está formado por una fase inorgánica impura, hidroxiapatita con un bajo grado de cristalinidad estrechamente unida de forma regular a las fibras de colágeno. Durante el proceso de mineralización de los tejidos óseos, el colágeno se sintetiza primero, se extruye de la célula y después se autoensambla en el espacio extracelular antes de que comience la mineralización. Esta es la razón por la cual el hueso es el ejemplo típico de un proceso de mineralización de "una matriz orgánica mediada". La micrografía de transmisión electrónica muestra que los cristales de hueso tienen una forma básica de prisma. Son los cristales más pequeños que tienen formación biológica, cuya longitud y anchura cambia dependiendo del tipo de hueso. Se han encontrado cristales de apatita más pequeños (espesor de 2-5 nm y una longitud de 35 nm y una anchura de 40 nm) en tendón de pavo calcificado.

25 Hoy en día, el problema de la falta de hueso ha crecido debido a varios factores, tales como la espectacular extensión cada vez mayor de acontecimientos, cánceres, osteoporosis, cirugías de revisión de prótesis. Debe destacarse que la duración de las prótesis en el tiempo está limitada a aproximadamente diez años y, por tanto, cuando la prótesis ha de reemplazarse se han de llenar cavidades con tejido similar al hueso.

Las técnicas principales para preparar materiales similares a hueso conocidas hasta hoy en día se citan a continuación.

30 Recolecciones autógenas tomando de los pacientes una porción de hueso, normalmente de la cresta ilíaca (área ósea cartilaginosa), que puede reproducir y generar tejido óseo. No obstante, es obvio que este procedimiento sólo permite rellenar pequeños huecos en el hueso.

35 Preparación de material sustitutivo de hueso tomando hidroxiapatita de cadáveres humanos y animales, y su posterior tratamiento a temperatura elevada con ácidos para evitar las respuestas inmunitarias. No obstante, dichos tratamientos no son suficientes para garantizar la eliminación de ciertas formas virales, ya que el virus puede cristalizar y resistir los tratamientos ácidos, también a temperaturas altas.

40 Preparación de hidroxiapatita con materiales de laboratorio. No obstante, esto tiene inconvenientes relacionados con el hecho de que esta hidroxiapatita no tiene las mismas propiedades que la hidroxiapatita natural formada mediante un proceso de mineralización en fibrillas de colágeno. Con el fin de obtener materiales compuestos de hidroxiapatita de proteína orgánica, se pueden preparar algunas matrices proteicas que tengan una composición química y una estructura molecular diferentes. Con este fin se ha usado un enfoque biomimético para sintetizar fosfatos de calcio en diversas matrices macromoleculares, que actúan como moldes y producen un depósito orientado de minerales. Las propiedades físico-químicas de los materiales compuestos de hidroxiapatita de proteína orgánica están fuertemente afectadas no sólo por las interacciones químicas entre los cristales de hidroxiapatita y la matriz proteica, sino también por la organización estructural de dicha matriz. En este caso, se ha usado glutaraldehído como agente reticulante para organizar moléculas de gelatina; en otros casos se ha usado un procedimiento de titulación y coprecipitación simultánea con atelocolágeno porcino como material de partida.

El colágeno, la hidroxiapatita y sus mezclas son bien conocidos. Por el contrario, no se conoce ningún procedimiento para preparar un material compuesto orgánico de cerámica que tenga las mismas propiedades que el tejido óseo humano.

55 Kikuchi M y col., Biomaterials 22/2001) sintetizaron un compuesto de hidroxiapatita y colágeno mediante un procedimiento de coprecipitación y titulación simultáneos usando  $(OH)_2$ ,  $H_3PO_4$  y atelocolágeno porcino.

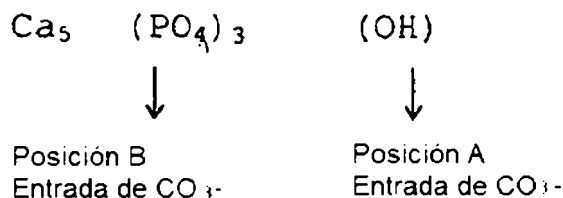
60 La presente invención está dirigida a preparar tejido óseo artificial que tenga las mismas propiedades que el tejido óseo humano. Dicho objetivo se consigue mediante la presente invención a través de un procedimiento de nucleación directa de una fase de apatita sobre fibrillas de colágeno, en el que una solución de sales de calcio que estimulan la formación de hidroxiapatita se hace reaccionar con polímeros naturales similares al colágeno en una suspensión ácida. Después, gota a gota se añade a la mezcla de sales de calcio en solución acuosa y polímeros naturales similares al colágeno en suspensión ácida un componente fosfórico en solución acuosa. El producto obtenido de este modo sufre liofilización y/o filtración y secado.

La estructura del polímero natural similar al colágeno se transfiere a nivel molecular la información, lo que permite una sustitución química de la hidroxiapatita, del mismo modo que ocurre en el cuerpo humano, es decir se deja

entrar a los sustituyentes, tales como fracciones de carbonato y fracciones iónicas de tipo fosfato presentes en la mezcla de reacción. El producto obtenido mediante dicho procedimiento tiene las mismas propiedades que el tejido óseo humano gracias a la presencia de dichos sustituyentes en la estructura del material compuesto obtenido de este modo.

La nucleación directa actúa como mecanismo biológico formando nanocristales de hidroxiapatita cultivados en paralelo al eje largo de las fibrillas de colágeno, del mismo modo que en el cuerpo humano, y tiene como resultado un componente inorgánico con un bajo grado de cristalinidad, caso amorfo y, por tanto, altamente soluble. Las cristalitas obtenidos de este modo crecen más y su tamaño es de algunos nanómetros. La nucleación de la hidroxiapatita en el colágeno implica una carbonatación de la fase inorgánica, es decir, la incorporación de  $\text{CO}_3^{2-}$  en un retículo de hidroxiapatita durante la nucleación en el sitio B en la misma proporción que en el tejido óseo natural calcificado. La carbonatación puede asignarse después únicamente a la posición B. La interacción de hidroxiapatita con colágeno evita la carbonatación en la posición A y es probable que bloquee el acceso a los grupos  $-\text{OH}$ . Esta desviación de la estequiometría aumenta, sorprendentemente, la similitud con el tejido óseo natural y, por tanto, no sólo la microestructura sino también la composición del tejido óseo artificial obtenido son las mismas que las del tejido óseo natural. La carbonatación en la posición B es ventajosa con respecto a la carbonatación en la posición A ya que, como consecuencia, la bioactividad y la biodegradabilidad del tejido óseo artificial obtenido son mayores, cuyas propiedades son esenciales para la calcificación porque permiten un intercambio dinámico continuo entre el fluido fisiológico y la célula usando los iones para la formación de hueso.

#### FÓRMULA



La presente invención usa un enfoque biológico para sintetizar cristales de hidroxiapatita en las fibrillas de colágeno de auto-ensamblaje idénticos a los nanocristales del hueso natural, lo que explora la capacidad de los grupos carboxílicos de colágeno con carga negativa para unirse a los iones de hidroxiapatita cálcica; siguiendo este enfoque se ha mostrado con éxito que los sistemas biológicos almacenan y procesan la información a nivel molecular. Esta es la razón por la cual las moléculas de colágeno de tipo I sin telopéptidos y sin regiones glucosiladas, que se pueden autoagregar en las fibrillas, sin agentes de reticulación se han usado como materiales de partida.

#### Preparación de colágeno

El colágeno de tipo I (tomado de tendón de caballo) se ha obtenido en el mercado como producto estándar. Tras la purificación, el colágeno de tipo I se disuelve en un volumen calculado de ácido acético hasta que se obtiene una suspensión homogénea (1% de colágeno).

Procedimiento de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con la presente invención se han usado sales de calcio en solución acuosa que estimula la formación de hidroxiapatita, escogidas de hidróxido de calcio. Además, se ha usado una suspensión ácida de polímero natural similar al colágeno, obtenida mediante tratamiento de colágeno animal tomado de tendón de caballo, cola de ratón, cola de canguro, o de polímero sintético similar al colágeno o de gelatinas químicamente reticuladas. El componente de fosfato usado se escoge de ácido fosfórico en solución acuosa. Las sales de calcio usadas en la presente invención están en una cantidad de 1 a 4 g/l, el componente fosfato está en una cantidad de 2 g/l a 4 g/l. Más preferentemente, las sales de calcio usadas en la presente invención están en una cantidad de 2 a 3 g/l, el componente fosfato está en una cantidad de 3 a 4 g/l.

La etapa de nucleación directa tiene lugar a un valor de pH de 10 a 11 y a una temperatura de, preferentemente, 25 a 45°C, más preferentemente de 35 a 40°C.

Gota a gota se añade una solución de ácido fosfórico (1,17 g, de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en 200 cc de  $\text{H}_2\text{O}$ ) y 50 g de colágeno en ácido acético en una solución acuosa de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (1,47 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en 300 cc de  $\text{H}_2\text{O}$ ). El valor del pH durante el procedimiento fue de 10-11, la temperatura fue de alrededor de 25°C, el tiempo de adición gota a gota de la solución de ácido fosfórico a la mezcla de sales de calcio en solución acuosa y la suspensión ácida de colágeno fue de 15 a 60 minutos y, por tanto, la velocidad del goteo fue, preferentemente, de 0,0133 l/minuto a 0,0033 l/minuto, más preferentemente de 0,0100 a 0,0060 l/minuto.

A continuación, los productos obtenidos, denominados HA/Col<sub>nuc</sub>, sufrieron una etapa de liofilización o secado.

Después, los productos compuestos se han caracterizado por análisis cristalográficos mediante análisis cristalográfico con un difractómetro de rayos X (Rigaku Miniflex); para el análisis de orientación se han registrado fotográficamente algunos gráficos de difracción con una distancia muestra- película de 70 mm usando una cámara plana (siempre con una radiación Cu-K $\alpha$ ).

Después se ha realizado un análisis termogravimétrico (Polymer STA 1660) usando un crisol de alúmina en aire y una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

#### *Análisis de los materiales compuestos*

Los materiales compuestos preparados con el procedimiento de acuerdo con la presente invención, mediante nucleación directa de hidroxiapatita en fibrillas de colágeno, tenían una composición nominal de hidroxiapatita/colágeno de 80/20 y 60/40 en peso. No obstante, el análisis termogravimétrico ha mostrado que la composición real era de 65/35 y 50/50, respectivamente. Esta diferencia se debe al rendimiento de reacción que no alcanza el 100%. El contenido en agua del compuesto es muy similar al del colágeno puro (10%). Este análisis se ha usado con éxito para obtener información sobre las modificaciones de las relaciones estructurales entre las fibrillas de colágeno y la fase inorgánica como función del contenido mineral. Dicho análisis se ejecutó previamente en el tendón flexor de una pata de pavo, que se usa como modelo del proceso de calcificación.

De hecho, los gráficos TG-DTG (termogravimetría - termogravimetría digital) de la figura 1 son diferentes de los de los compuestos de hidroxiapatita/colágeno, que muestran una interacción de la fase orgánica con las fibras de colágeno. Este tipo de interacción se puede comparar con el proceso de calcificación que se produce en la naturaleza. La Figura 1a muestra los gráficos TG-DTG que atañen a una pata de pavo calcificada, usada como modelo óseo teórico. La estrecha similitud es evidente ya que en ambos casos el pico de DTG a 450-500°C tiende a desaparecer formando un “hombro más amplio”. Puede suponerse que, cuando se produce una nucleación directa de hidroxiapatita en colágeno, el material compuesto se comporta como tejido calcificado de forma natural.

El difractograma XRD de la figura 2 muestra un gráfico típico de hidroxiapatita con una cristalinidad muy baja, el tamaño de las cristalitas identificadas sobre el eje c es de aproximadamente 12-15 nm. La nucleación se produce de acuerdo con el proceso típico del hueso natural, en el que el nanotamaño de los cristalitos es responsable de la ampliación del reflejo en el gráfico. Además, dado que la reacción se ha llevado a cabo a aproximadamente 25°C se pueden obtener nanocristales de hidroxiapatita monocristalina con un elevado grado de certeza. Tales nanocristales crecen dentro de las fibras de colágeno con su eje c orientado, preferentemente, paralelo a la dirección de orientación de la fibra. De hecho, el gráfico de difracción de ángulo amplio en rayos X se obtiene comenzando desde una muestra constituida por algunas fibrillas calcificadas.

La figura 3 muestra el reflejo (002) de la hidroxiapatita a 0,344 nm, preferentemente orientada paralela a la dirección de orientación típica del colágeno molecular a una distancia de 0,29 nm. La micrografía TEM de las figuras 4a y 4b muestra nanonúcleos formados dentro de las fibrillas de colágeno que crecen en paralelo a dichas fibrillas. En particular, la figura 4a muestra una etapa inicial de nucleación, mientras que la figura 4b muestra una etapa avanzada del crecimiento del núcleo.

Dichas técnicas analíticas han mostrado fuertes interacciones entre los dos componentes de hidroxiapatita y una completa analogía del material compuesto con tejido natural calcificado.

Además, el análisis con un microscopio óptico muestra la diferente morfología cristalina del material compuesto hidroxiapatita/colágeno obtenido mediante nucleación directa y después liofilizado a partir del secado al aire. Los materiales compuestos liofilizados muestran una red tridimensional caracterizada por una distribución de poro muy amplia semejante a la del algodón y la lana. Cuando la muestra se ha secado al aire en un filtro se forma una red bidimensional y su estructura se asemeja a la de una gasa.

El tejido óseo artificial de acuerdo con la presente invención se puede obtener con diferentes cantidades de hidroxiapatita/colágeno y varias formulaciones y se aplica a varios usos químicos. Tal tejido óseo artificial se puede usar como prótesis, sustituto de hueso o material de relleno de hueso, como membrana de reconstrucción o tejido hemostático en cirugía ortopédica, dental, maxilofacial.

#### **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: Gráficos de TG-DTG (termogravimetría-termogravimetría digital) de materiales compuestos obtenidos mediante nucleación directa.

Figura 1a: Gráficos de TG-DTG (termogravimetría-termogravimetría digital) de tendón de pavo calcificado usado como modelo óseo teórico.

## ES 2 334 503 T3

Figura 2: Difractograma en rayos X de hidroxiapatita de baja cristalinidad.

Figura 3: Medidas de difracción con cámara plana que muestran la orientación del eje C de la fibra cristalina de hidroxiapatita en la misma dirección que el eje largo de la fibra.

5

Figura 4a: Micrografía TEM de los nanonúcleos formados *in situ*, en una etapa inicial de desarrollo.

Figura 4b: Micrografía TEM de los nanonúcleos formados *in situ*, en una etapa avanzada de desarrollo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para sintetizar un tejido óseo artificial que comprende:

5 Nuclear directamente nanocristales de una hidroxiapatita monocristalina dentro de fibras de colágeno añadiendo gota a gota una solución acuosa de ácido fosfórico y colágeno en ácido acético a una solución acuosa de hidróxido cálcico; liofilizar o secar el producto obtenido de este modo.

10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la velocidad de la adición gota a gota es de 0,0133 l/minuto a 0,0033 l/minuto.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la velocidad de la adición gota a gota es de 0,01 a 0,006 l/minuto.

15 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de nucleación directa tiene lugar a un valor de pH de 10-11.

20 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de nucleación directa se lleva a cabo a aproximadamente 25°C.

25 6. Tejido óseo artificial obtenido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso como prótesis, sustituto de hueso, material de relleno de hueso, como membrana de reconstrucción, tejido homeostático y hemostático y en aplicaciones dentales.

30

35

40

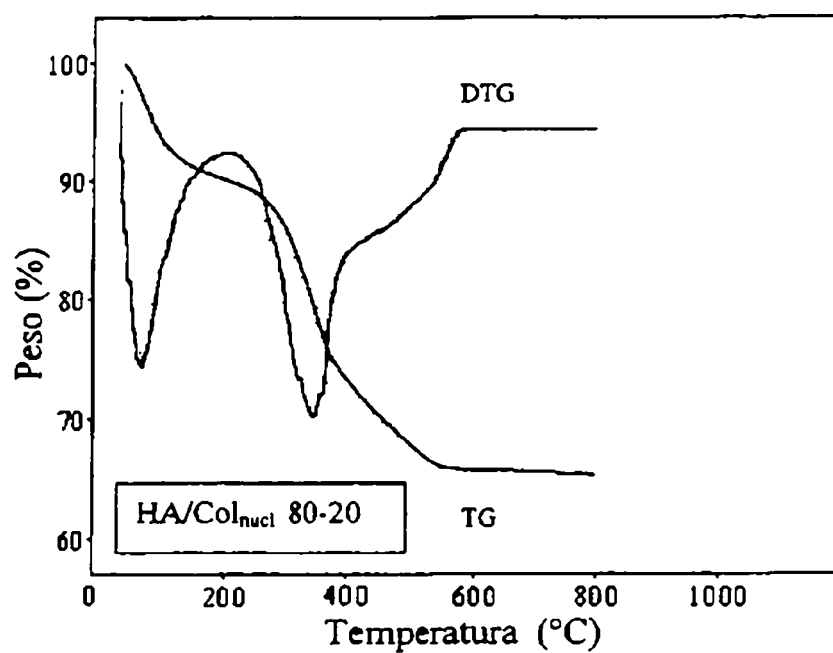
45

50

55

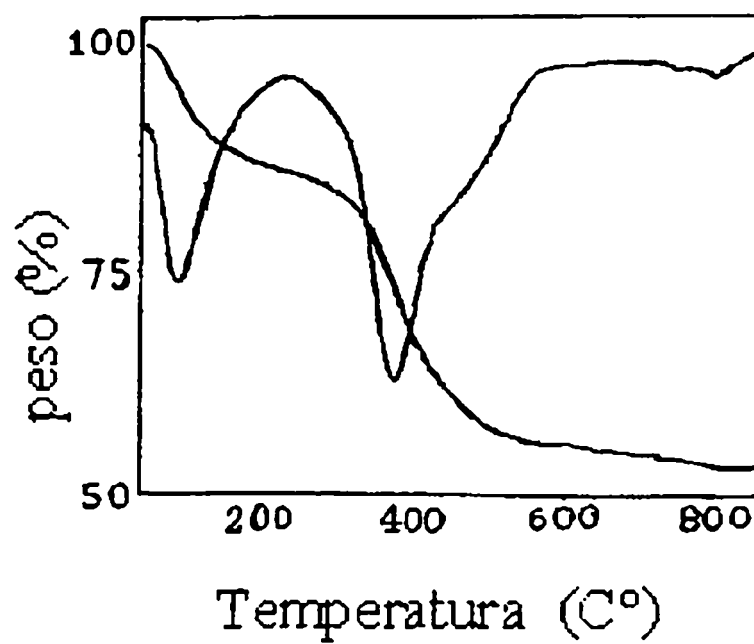
60

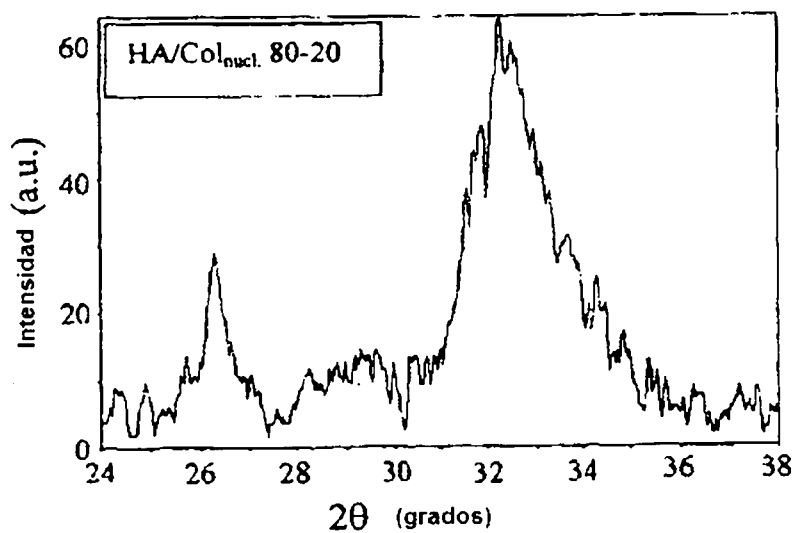
65



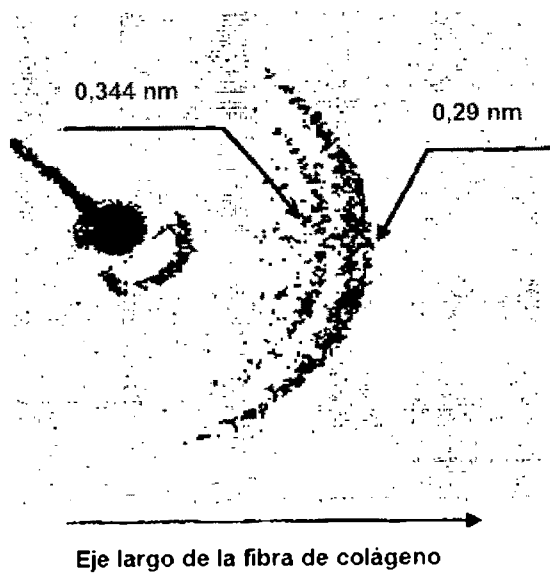
**Fig. 1**

**Fig. 1a**





**Fig. 2**

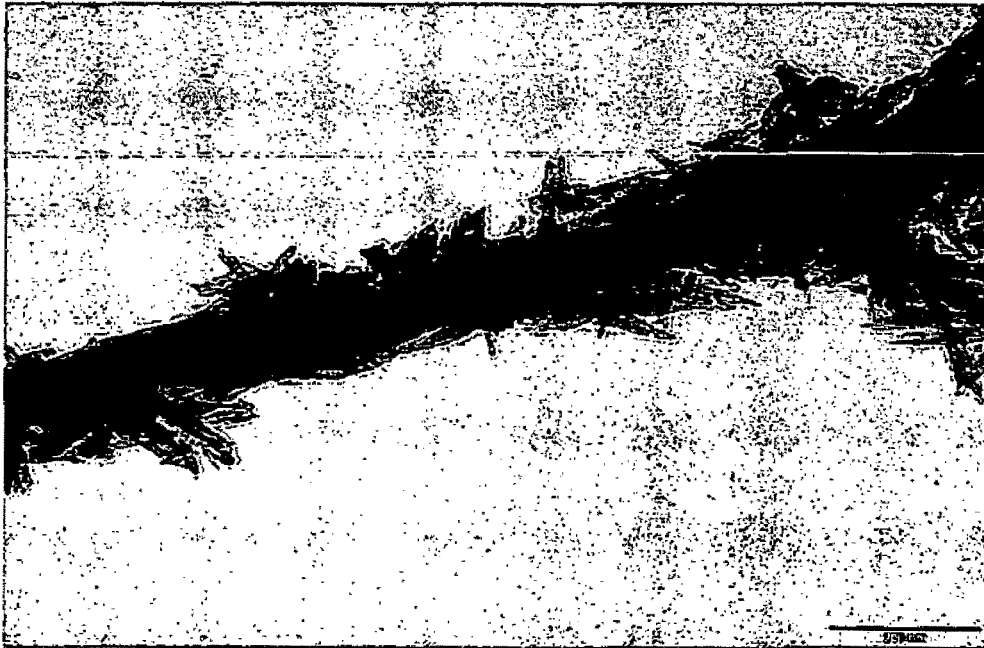


**Fig. 3**





**Fig. 4a**



**Fig. 4b**