

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 230**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)
A61L 27/32 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2017** **PCT/EP2017/077505**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2018** **WO18078044**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2017** **E 17797277 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2021** **EP 3532111**

54 Título: **Composición bioactiva ósea y usos de la misma**

30 Prioridad:

26.10.2016 EP 16195718
26.09.2017 EP 17382638

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2021

73 Titular/es:

BIOINTELLIGENCE SYSTEMS S.L. (100.0%)
Bruc 78 1-1
08009 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

AL ATARI ABOUASI, MAHER y
CALVO GUIRADO, JOSÉ LUIS

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 867 230 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

Composición bioactiva ósea y usos de la misma

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la biomedicina y en particular, a composiciones para su uso en la promoción de la osteogénesis. Específicamente, la presente invención incluye composiciones para la regeneración de tejido óseo dental cuando se usa un implante y/o en caso de enfermedades periodontales.

10

Antecedentes de la técnica

Uno de los grandes problemas a los que se enfrenta el campo de los implantes es el fallo del injerto adecuado del implante en el hueso, conduciendo a la pérdida del implante. Para reducir el fallo del implante, varias modificaciones de propiedades específicas de la superficie tales como estructura, química, carga superficial y humectabilidad se han investigado para mejorar la unión a proteínas y la osteointegración de los implantes de titanio (Albrektsson T, *et al.* "Osseointegrated titanium implants Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man" *Acta Orthop Scand* 1981,52:155-170).

Algunos péptidos y proteínas, incluyendo colágeno y fibronectina, se han usado para mejorar la bioactividad de los materiales. Ambas proteínas forman parte de las proteínas de la matriz extracelular y se ha demostrado que promueven la adhesión celular a los sustratos (Mohan S, *et al.* "Bone growth factors" *Clin Orthop Relat Res* 1991,263:30-48). Para la mayoría de los tipos celulares, incluyendo las células del tejido conectivo tales como los osteoblastos y sus precursores, la adhesión a la matriz extracelular es esencial para la supervivencia (Urist MR, *et al.* "Bone cell differentiation and growth factors" *Science* 1983,220:680-686; Wozney JM, *et al.* "Growth factors influencing bone development" *J Cell Sci Suppl* 1990,13:149-156; Anselme K "Osteoblast adhesion on biomaterials" *Biomaterials* 2000,21:667).

Además, se demostró previamente que la carga neta negativa del óxido de superficie de la aleación mejoraba la capacidad intrínseca de la proteína para unirse a los receptores de integrina de células osteogénicas y promover la propagación celular (Anselme K "Osteoblast adhesion on biomaterials" *Biomaterials* 2000,21:667; Scotchford CA, *et al.* "Chemically patterned, metaloxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein-and cell-interactions. II: Protein adsorption and early cell interactions" *Biomaterials* 2003,24:1147; Steele JG, *et al.* "Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment" *J Biomater Sci Polym Ed* 1993,5:245; Howlett CR, *et al.* "Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture" *Biomaterials* 1994,15:213; Kilpadi KL, *et al.* "Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel" *J Biomed Mater Res* 2001,57:258; García AJ "Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions" *Biomaterials* 2005,26:7525).

40

El documento US20070213832 (Wen Hai B) describe un implante de fosfato de calcio que se sumerge en HBSS (solución salina tamponada de Hank) o PBS común durante 5 días, se enjuaga con agua destilada y después se seca al aire durante 24 horas, dando como resultado la observación microscópica de una capa mineral nanoporosa. El documento no describe ningún efecto biológico derivado del proceso anterior. La capa mineral se usa como vehículo de administración para composiciones bioactivas. En este sentido, el documento describe que se puede lograr una capacidad osteogénica incorporando en la capa mineral agentes bioactivos tales como factores de crecimiento. Por lo tanto, el efecto osteogénico no está relacionado con la propia capa mineral ni con el uso de la composición de PBS, sino a los agentes bioactivos incorporados a la capa mineral.

Lindahl C, 2012 describe un método para formar una superficie similar a la apatita en sustratos de titanio para imitar el hueso natural, que comprende la etapa de sumergir el sustrato de titanio en PBS o SBF (fluido corporal simulado - Kokubo) normalmente a 37 °C durante un período de días a semanas, secar y esterilizar. El resultado es una superficie similar a la apatita que puede modificarse o funcionalizarse aún más para mejorar las propiedades del recubrimiento del implante, por ejemplo, mediante la incorporación de fármacos promotores del hueso como el bifosfonato (Lindahl C. "Biomimetic deposition of hydroxyapatite on titanium implant materials" *Uppsala Univ.* 1 de enero de 2012, páginas 978-91).

De manera similar, Lindberg F *et al.*, 2008 describe un método para formar una superficie similar a la apatita sobre material de titanio, que comprende sumergir en una solución de PBS precalentada a 37 °C de 1 a 4 semanas, aclarar con agua desionizada y secar al aire. Después de este proceso, la hidroxiapatita precipitada puede observarse mediante XRD (Lindberg F. *et al.*, "Hydroxylapatite growth on single crystal rutile substrates" *Biomaterials*, Elsevier Science Publishers BV, Barking GB, vol. 29, n.º 23, 1 de agosto de 2008 páginas 3317-23)

Además, otro gran problema al que se enfrenta la odontología es el tratamiento y la prevención de peri-implantitis y periodontitis. La peri-implantitis se define como un proceso inflamatorio destructivo que afecta a los tejidos blandos y

duros que rodean los implantes dentales producidos o inducidos por bacterias que colonizan los implantes dentales y su entorno. Por otro lado, la periodontitis se caracteriza por la destrucción del tejido conectivo y del soporte óseo dental después de una respuesta inflamatoria del hospedador secundaria a una infección por bacterias periodontales. Ambas enfermedades se tratan actualmente con antibióticos y con una higiene dental aumentada o mejorada. No obstante, todavía conducen a veces a la pérdida del implante o del diente y/o daños graves en el tejido circundante (tejido conectivo y hueso dentario).

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de proporcionar medios para evitar el fallo del implante y, de esta manera, promover un injerto adecuado del implante, más específicamente, con implantes dentales que normalmente son implantes de titanio. Además, como se indica anteriormente, también sigue existiendo la necesidad de encontrar composiciones para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades periodontales con pérdida de tejido óseo tales como periodontitis y peri-implantitis.

Sumario de la invención

Un problema a resolver por la presente invención puede verse relacionado con la provisión de medios capaces de evitar el fallo del implante y promover el injerto adecuado del implante con los tejidos circundantes, específicamente cuando se usan implantes dentales.

La solución se basa en la provisión de composiciones y kits que se ha descubierto sorprendentemente que promueven la osteogénesis. Específicamente, promueven, aumentan y aceleran la osteogénesis del tejido óseo circundante del implante, por lo tanto, regenerando o remodelando el tejido óseo, promoviendo el injerto del implante y evitando la pérdida del implante.

Dado que las composiciones y kits de la invención promueven la osteogénesis por sí mismos, también son útiles en el tratamiento de enfermedades periodontales con pérdida de tejido óseo tales como periodontitis y peri-implantitis.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición bioactiva ósea que comprende una solución salina basada en agua que comprende dihidrogenofosfato sódico y cloruro sódico, para su uso en la promoción de la osteogénesis, como se define en las reivindicaciones.

La expresión "composición bioactiva ósea" significa que la composición es activa o reactiva con el tejido óseo; es decir, que tiene un efecto sobre, interactúa con o provoca una respuesta del tejido óseo. En otras palabras, eso significa que la composición interactúa y reacciona con el tejido óseo en cierta extensión. La máxima extensión de esta "bioactividad" o reacción sería la reparación ósea. El término "bioactivo" se usa habitualmente en el campo de los implantes y prótesis; por ejemplo, los "vidrios bioactivos" son un grupo de biomateriales vitrocerámicos de superficie reactiva. Son biocompatibles y bioactivos, siendo así útiles como materiales de implante en el cuerpo humano para reparar y reemplazar huesos enfermos o dañados.

La expresión "promover la osteogénesis" tiene el significado que se entiende generalmente en la técnica; es decir, promover el desarrollo y la formación del hueso. La osteogénesis también se conoce como osificación y es el proceso de depositar nuevo material óseo mediante células llamadas osteoblastos.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición bioactiva ósea que comprende una solución salina basada en agua que comprende dihidrogenofosfato sódico en una concentración de 8 a 12 mM en la solución, cloruro sódico en una concentración de 130 a 140 mM en la solución, hidrogenofosfato potásico en una concentración de 1,4 a 2,2 mM en la solución, cloruro potásico en una concentración de 2,3 a 3,1 mM en la solución, una sal de calcio en una concentración de 7 a 15 mM en la solución, una sal de un metal divalente diferente del calcio en una concentración de 2 a 12 mM en la solución y un agente quelante.

Otro aspecto de la invención es la composición bioactiva ósea descrita anteriormente para su uso en la promoción de la osteogénesis.

Otro aspecto de la invención es un kit que comprende una composición como se describe anteriormente y un implante.

Otro aspecto de la invención es el uso de los kits mencionados anteriormente para promover la osteogénesis.

Otro aspecto de la invención es un proceso para preparar la composición de acuerdo con el primer aspecto que comprende mezclar todos los elementos en forma sólida de la composición con agua hasta su completa homogeneización.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición bioactiva ósea, de acuerdo con el primer aspecto, para el tratamiento de la superficie de un implante metálico antes de la implantación.

Se cree que la presente invención proporciona la primera composición líquida que promueve la osteogénesis, con una

muy fácil aplicación y especialmente útil cuando se usa un implante metálico. Por lo tanto, con la composición de la invención no es necesario modificar la superficie del implante para mejorar la unión a proteínas y la osteointegración de los implantes; que son las estrategias que se utilizan actualmente en la técnica. Sin desear quedar limitado a teoría alguna, se cree que las composiciones propuestas en el presente documento promueven la osteogénesis, favoreciendo la formación de hueso, aumentando la producción de tejido óseo y también mejorando la calidad del hueso producido. Esto se observa en el Ejemplo 1 proporcionado a continuación, donde se estudia la influencia de la composición bioactiva ósea en la expresión de marcadores óseos en cultivos celulares *in vitro*. La diferente expresión de genes mostrada en las Figuras 1 y 2 se correlaciona con el favorecimiento de la formación ósea. Además, cuando el implante se trata con la composición bioactiva ósea de la presente invención, la producción de hueso aumenta y la calidad del hueso producido es más alta.

Como segundo punto ventajoso, la composición bioactiva ósea acelera enormemente el proceso de formación ósea. Este descubrimiento se confirma con el estudio del Ejemplo 2 y la FIGURA 3 de la influencia de la composición bioactiva ósea en la excreción de calcio y la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) durante la formación ósea en cultivos celulares *in vitro*. Puede observarse que en el caso de cultivos celulares con discos de implante tratados con la composición bioactiva ósea, el pico de excreción de calcio puede verse antes (véase el aumento en el día 3), mostrando una formación más temprana del hueso (FIGURA 3). En cuanto a ALP, un aumento de la actividad de dicha proteína también está relacionado con la formación de hueso. Los resultados obtenidos para la actividad ALP aparecen resumidos en la FIGURA 4. Una tendencia similar a la que se ve en la FIGURA 3 puede verse en la FIGURA 4, es decir, pico temprano en el día 3 de actividad de ALP que muestra formación ósea temprana. Por lo tanto, los resultados obtenidos para la concentración de calcio y la actividad ALP se correlacionan perfectamente y son consistentes con una formación ósea temprana inducida por la composición bioactiva ósea de la presente invención.

Estas observaciones se confirman *in vivo* al estudiar la influencia de la composición bioactiva ósea en el injerto de implante-hueso en conejos (Ejemplo 3). Para este estudio se utilizaron 60 implantes dentales divididos en tres grupos: A implante sin tratamiento; B composición activa implante+hueso a pH 7,4; y C composición activa implante+hueso a pH 7,6. En términos generales, a partir de las FIGURAS 5 a 7 puede verse que en los grupos B y C se induce una formación temprana de hueso (incluso más temprana y mayor en el último). Esta diferencia se mantuvo durante todo el período de tiempo experimental (es decir, hasta el día 60). Además, a partir de la tabla 3 también es derivable un BIC (contacto de hueso a implante) más temprano y aumentado en los grupos B y C en comparación con el grupo A. Además, y sorprendentemente, como también se ve en las FIGURAS 5 a 7, el grupo C también mostró un aumento en todos los puntos de tiempo cuando se compara con el grupo B.

Por lo tanto, notablemente, sin las composiciones y kits de la invención, un implante dental tarda tres meses en injertarse correctamente, mientras que usando las composiciones y kits de la invención, el injerto se acelera enormemente y solo tarda 15 días. Esto representa una gran ventaja para el paciente y el médico.

Se ha observado en los experimentos proporcionados en el presente documento (por ejemplo, Ejemplo 4 y FIGURA 9) que las diferentes composiciones descritas anteriormente son útiles para promover la osteogénesis. Específicamente la FIGURA 9 muestra que la composición básica de PBS mejora el crecimiento óseo. Se probaron adicionalmente dos PBS comerciales diferentes y todos dieron resultados similares. El PBS comercial, que contiene bajas concentraciones de $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$, también mejora el crecimiento óseo. Adicionalmente, la combinación de PBS+EDTA mejora el crecimiento óseo en una extensión similar a la de PBS. No obstante, notablemente, la combinación PBS+ $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$ con concentraciones más altas de $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2$ presenta más capacidad osteogénica en comparación con el tratamiento solo con PBS o con PBS+EDTA y la combinación de PBS+ $\text{CaCl}_2 + \text{MgCl}_2 + \text{EDTA}$ muestra una capacidad osteogénica incluso más sorprendente en comparación con los otros tratamientos.

Adicionalmente, el ejemplo 6 muestra que la composición bioactiva ósea es capaz de promover la osteogénesis en combinación con una gran diversidad de materiales, también cuando se usan biomateriales para la reconstrucción ósea (como xenoinjertos o material de dientes rectificadas) en lugar de implantes metálicos.

Notablemente, la composición bioactiva ósea es capaz de promover la osteogénesis sin presencia de implante. Los resultados del ejemplo 7 muestran, debido al uso de la composición bioactiva ósea, una calcificación mejorada de las células parecidas a cementoblastos junto con una recuperación de las fibrillas de colágeno del ligamento periodontal, que es el principal defecto de la periodontitis.

Las composiciones de la invención también muestran ventajas relevantes desde un punto de vista práctico. Todos los elementos de la composición bioactiva ósea se usan en condición GMP; la composición puede usarse en cualquier clase de superficie de titanio; su fabricación no es complicada y no es cara; el procedimiento es muy fácil porque el implante se sumerge solo 2 minutos en la composición bioactiva ósea antes de la inserción en el hueso, por lo tanto, el manejo de la composición bioactiva ósea no tiene esfuerzo en procedimientos quirúrgicos para la regeneración ósea o peri-implantitis.

La descripción detallada y los ejemplos que se muestran a continuación se presentan con los fines de proporcionar a

los expertos en la materia una explicación suficientemente clara y completa de esta invención, pero no deben considerarse limitaciones sobre los aspectos esenciales contemplados en la misma, como se presenta en secciones anteriores de esta descripción.

5 Descripción detallada de la invención

Composición que comprende solución salina basada en agua y preparación de la misma

La invención proporciona una composición bioactiva ósea que comprende una solución salina basada en agua que comprende dihidrogenofosfato sódico y cloruro sódico, que es útil para su uso en la promoción de la osteogénesis.

En dicha composición bioactiva ósea, el dihidrogenofosfato sódico está en una concentración de 8 a 12 mM en la solución y el cloruro sódico está en una concentración de 130 a 140 mM en la solución. Particularmente, el dihidrogenofosfato sódico está en una concentración de 9 a 11 mM en la solución. Preferentemente, la concentración de dihidrogenofosfato sódico está en un valor o en un subintervalo entre el intervalo de 8 a 12 mM, esto es, a 8 mM, 8,5 mM, 9 mM, 9,5 mM, 10 mM, 10,5 mM, 11 mM, 11,5 mM o 12 mM. Más preferentemente, la concentración de dihidrogenofosfato sódico es 10 mM y más preferentemente, 10,14 mM.

Independientemente, en una realización particular, el cloruro sódico está en una concentración de 130 a 140 mM en la solución. Particularmente, el cloruro sódico está en una concentración de 132 a 138 mM en la solución. Preferentemente, la concentración de cloruro sódico está en un valor o en un subintervalo entre el intervalo de 130 a 140 mM, esto es, a 130 mM, 130,5 mM, 131 mM, 131,5 mM, 132 mM, 132,5 mM, 133 mM, 133,5 mM, 134 mM, 134,5 mM, 135 mM, 135,5 mM, 136 mM, 136,5 mM, 137 mM, 137,5 mM, 138 mM, 138,5 mM, 139 mM, 139,5 mM o 140 mM. Más preferentemente, la concentración de cloruro sódico es 137 mM, y más exactamente, 136,99 mM.

La solución de sal basada en agua comprende además hidrogenofosfato potásico y cloruro potásico.

El hidrogenofosfato potásico está en una concentración de 1,4 a 2,2 mM en la solución. Particularmente, el hidrogenofosfato potásico está en una concentración de 1,6 a 2 mM en la solución. Preferentemente, la concentración de hidrogenofosfato potásico está en un valor o en un subintervalo entre el intervalo de 1,4 a 2,2 mM, esto es, a 1,4 mM, 1,5 mM, 1,6 mM, 1,7 mM, 1,8 mM, 1,9 mM, 2,0 mM, 2,1 mM o 2,2 mM. Más preferentemente, la concentración de hidrogenofosfato potásico es 1,8 mM y más preferentemente, 1,76 mM.

El cloruro potásico está en una concentración de 2,3 a 3,1 mM en la solución. Más particularmente, el cloruro potásico está en una concentración de 2,5 a 2,9 mM en la solución. Preferentemente, la concentración de cloruro potásico está en un valor o en un subintervalo entre el intervalo de 2,3 a 3,1 mM, esto es, a 2,3 mM, 2,4 mM, 2,5 mM, 2,6 mM, 2,7 mM, 2,8 mM, 2,9 mM, 3,0 mM o 3,1 mM. Más preferentemente, la concentración de cloruro potásico es 2,7 mM, y más exactamente, 2,68 mM.

El pH de la solución es de entre 7,0 y 7,8. Particularmente, el pH está en un valor o en un subintervalo entre el intervalo de 7,0 y 8,0, esto es a 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 u 8,0. Más preferentemente, el pH está entre 7,4 y 7,8. Más preferentemente, el pH está entre 7,5 y 7,7. Más preferentemente, el pH de la solución es 7,6. Es de destacar, que, sorprendentemente, la composición de la presente invención a pH 7,6 muestra incluso efectos aumentados, como resultará evidente a partir de los ejemplos incluidos a continuación. Más específicamente, la composición de la presente invención, cuando se usó a dicho pH mostró una formación ósea incluso más temprana y una formación ósea aumentada.

En una realización particular, la solución de sal basada en agua comprende además cloruro magnésico y cloruro cálcico. Como alternativa, la solución puede comprender una sal de magnesio y una sal de calcio con un contraión diferente pero equivalente al cloruro, que no interfiere en la solución. En otra realización particular, la solución comprende una sal de calcio y una sal de un metal divalente diferente del calcio. El metal divalente puede ser, por ejemplo, berilio, magnesio, estroncio, bario, radio, cinc, cobre, níquel, manganeso (2+), hierro (2+), cromo (2+), platino (2+) o mercurio (2+). En una realización particular, el cloruro magnésico o la sal de un metal divalente diferente del calcio está en una concentración de 2 a 12 mM en la solución y el cloruro cálcico o la sal de calcio está en una concentración de 7 a 15 mM en la solución. Preferentemente, el cloruro magnésico o la sal de un metal divalente diferente del calcio se encuentra en una concentración de 4 a 10 mM. Preferentemente, la concentración de cloruro magnésico o la sal de un metal divalente diferente del calcio está en un valor o en un subintervalo entre el intervalo de 2 a 12 mM, esto es, a 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0 mM, 3,5 mM, 4,0 mM, 4,5 mM, 5,0 mM, 5,5 mM, 6,0 mM, 6,5 mM, 7,0 mM, 7,5 mM, 8,0 mM, 8,5 mM, 9,0 mM, 9,5 mM, 10,0 mM, 10,5 mM, 11,0 mM, 11,5 mM o 12,0 mM. Más preferentemente, la concentración de cloruro magnésico o la sal de un metal divalente diferente del calcio en la solución es de 8,4 mM.

Independientemente, en una realización particular, el cloruro cálcico o la sal de calcio se encuentra en una concentración de 7 a 15 mM en la solución. Particularmente, el cloruro cálcico o la sal de calcio se encuentra en una concentración de 9 a 12 mM en la solución. Preferentemente, la concentración de cloruro cálcico o la sal de calcio está en un valor o en un subintervalo entre el intervalo de 7 a 15 mM, esto es, a 7,0 mM, 7,5 mM, 8,0 mM, 8,5 mM,

9,0 mM, 9,5 mM, 10,0 mM, 10,5 mM, 11,0 mM, 11,5 mM, 12,0 mM, 12,5 mM, 13,0 mM, 13,5 mM, 14,0 mM, 14,5 mM o 15,0 mM. Más preferentemente, la concentración de cloruro cálcico o la sal de calcio es 10,81 mM.

En una realización particular, la solución de sal basada en agua comprende además un agente quelante. En una realización más particular, el agente quelante es EDTA. En una realización particular, la concentración de EDTA en la composición es de 25 mM a 100 mM. Particularmente, el EDTA está en una concentración de 40 a 80 mM en la solución. Preferentemente, la concentración de EDTA está en un valor o en un subintervalo entre el intervalo de 25 mM a 100 mM y preferentemente a 68,44 mM.

10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición bioactiva ósea que comprende una solución salina basada en agua que comprende dihidrogenofosfato sódico en una concentración de 8 a 12 mM en la solución, cloruro sódico en una concentración de 130 a 140 mM en la solución, hidrogenofosfato potásico en una concentración de 1,4 a 2,2 mM en la solución, cloruro potásico en una concentración de 2,3 a 3,1 mM en la solución, una sal de calcio en una concentración de 7 a 15 mM en la solución, una sal de un metal divalente diferente del calcio en una concentración de 2 a 12 mM en la solución y un agente quelante.

En una realización particular, la sal de calcio es cloruro cálcico y la sal de un metal divalente diferente del calcio es cloruro magnésico.

20 En una realización particular, la composición bioactiva ósea para promover la osteogénesis comprende una solución salina basada en agua que comprende dihidrogenofosfato sódico, cloruro sódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro potásico, cloruro magnésico, cloruro cálcico y EDTA. En una realización particular, la composición comprende una solución de sal basada en agua que comprende una solución de sal basada en agua que comprende dihidrogenofosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 137 mM, hidrogenofosfato potásico 1,8 mM, cloruro potásico 2,7 mM, 25 cloruro magnésico 8,4 mM, cloruro cálcico 10,8 mM y EDTA 68,4 mM. En una realización más particular, la composición comprende una solución salina basada en agua que comprende NaCl 136,99 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10,14 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, MgCl₂ 8,4 mM, CaCl₂ 10,81 mM y EDTA 68,44 mM, a un pH de entre 7,0 y 7,8 y más preferentemente de 7,6.

30 Por lo tanto, una composición bioactiva ósea particularmente útil para los propósitos de la invención comprende una solución salina basada en agua que comprende dihidrogenofosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 137 mM, hidrogenofosfato potásico 1,8 mM, cloruro potásico 2,7 mM, cloruro magnésico 8,4 mM, cloruro cálcico 10,8 mM y EDTA 68,4 mM. En una realización particular el pH de la solución es de 7,6.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición bioactiva ósea como se define anteriormente, para su uso en la promoción de la osteogénesis. Los ejemplos proporcionados demuestran que diferentes composiciones son útiles en la promoción de la osteogénesis para los fines de la invención. Estos incluyen particularmente, composiciones basadas únicamente en dihidrogenofosfato sódico y cloruro sódico; composiciones que comprenden además hidrogenofosfato potásico y/o cloruro potásico; composiciones que además comprenden magnesio y cloruro cálcico y 40 composiciones que además comprenden EDTA.

Algunos ejemplos de soluciones disponibles en el mercado se describen en el presente documento como ejemplos de composiciones que también pueden usarse para los fines de la invención. La solución de sal basada en agua usada en la invención a menudo se denomina "Solución salina tamponada con fosfato" (abreviado PBS). PBS se refiere a 45 una solución tampón que contiene al menos un fosfato y que se usa comúnmente para realizar técnicas de biología molecular y en cultivo celular, para realizar lavados y/o preparar reactivos. Los componentes básicos son dihidrogenofosfato sódico y cloruro sódico y, en algunas formulaciones, cloruro potásico y dihidrogenofosfato potásico. La osmolaridad y las concentraciones de iones de las soluciones coinciden con las del cuerpo humano (isotónicas). El PSB puede almacenarse a temperatura ambiente.

50 Hay muchas formas diferentes de preparar soluciones de PBS. Algunas formulaciones no contienen potasio ni magnesio, mientras que otras contienen calcio y/o magnesio. Algunos ejemplos de PBS se describen en el presente documento.

55 Tabla A. La composición más común de PBS (1X)

Sal	Concentración (mmol/l)	Concentración (g/l)
NaCl	137	8,0
KCl	2,7	0,2
Na ₂ HPO ₄	10	1,42
KH ₂ PO ₄	1,8	0,24

Método de preparación: Comenzar con 800 ml de agua destilada para disolver todas las sales. Ajustar el pH a 7,4 con HCl. Añadir agua destilada hasta un volumen total de 1 litro. El PBS 1x resultante debe tener una concentración final de PO_4^{3-} 10 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM.

5

Tabla B. Protocolo de Cold Spring Harbor:

reactivo	PM	masa (g) 10X	[M] 10X	masa (g) 1X	[M] 1X	[mM] 1x
Na ₂ HPO ₄	141,95897	14,1960	0,1000	1,41960	0,0100	10,0
KH ₂ PO ₄	136,08569	2,4496	0,0180	0,24496	0,0018	1,8
NaCl	58,44300	80,0669	1,3700	8,00669	0,1370	137,0
KCl	74,55150	2,0129	0,0270	0,20129	0,0027	2,7
pH = 7,4						

El pH de la solución madre 10x de PBS es -6,8, pero cuando se diluye con agua a PBS 1x debería cambiar a 7,4. Al preparar soluciones tampón, es una buena práctica medir siempre el pH directamente con un medidor de pH. En caso necesario, el pH se puede ajustar con ácido clorhídrico o hidróxido sódico.

10

La forma más sencilla de preparar una solución de PBS es usar comprimidos o saquitos o bolsas de tampón PBS. Están formulados para dar una solución de PBS lista para su uso al disolverse en una cantidad específica de agua destilada. Están disponibles en los volúmenes convencionales: 100, 200, 500 y 1000 ml y 10, 25, 50 y 100 l.

15 El PBS puede almacenarse a temperatura ambiente o en el refrigerador. Sin embargo, las soluciones madre concentradas pueden precipitar cuando se enfrían y deben mantenerse a temperatura ambiente hasta que el precipitado se haya disuelto por completo antes de su uso.

Tabla C. Solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Cold Spring Harbor)

Reactivo	Cantidad a añadir (para solución 1x)	Concentración final (1x)	Cantidad a añadir (para solución madre 10x)	Concentración final (10x)
NaCl	8 g	137 mM	80 g	1,37 M
KCl	0,2 g	2,7 mM	2 g	27 mM
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	10 mM	14,4 g	100 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	1,8 mM	2,4 g	18 mM
En caso necesario, PBS puede suplementarse con lo siguiente:				
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,133 g	1 mM	1,33 g	10 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10 g	0,5 mM	1,0 g	5 mM

20

El PBS puede prepararse como una solución 1x o como una solución madre 10x. Para preparar 1 l de PBS 1x o 10x, disolver los reactivos enumerados anteriormente en 800 ml de H₂O. Ajustar el pH a 7,4 (o 7,2, si es necesario) con HCl y después añadir H₂O a 1 l. Dispensar la solución en alícuotas y esterilizarlas en autoclave durante 20 min a 1,05 kg/cm² (15 psi) en ciclo líquido o por esterilización por filtro. Almacenar el PBS a temperatura ambiente.

25

Para una solución madre de 10 litros puede prepararse PBS 10x disolviendo:

30 800 g de NaCl,
20 g de KCl,
144 g de Na₂HPO₄ · 2H₂O
24 g de KH₂PO₄
8 l de agua destilada.

Después de completar la mezcla, rellenar la solución final a 10 l. El pH de la solución madre 10X será de aproximadamente 6,8, pero cuando se diluye a PBS 1x debería cambiar a 7,4. Al preparar soluciones tampón, es una buena práctica medir siempre el pH directamente con un medidor de pH. En caso necesario, el pH se puede ajustar con ácido clorhídrico o hidróxido sódico.

En dilución, el PBS 1x resultante debe tener una concentración final de NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM y un pH de 7,4.

El pH se ajusta con un ácido o una base, por ejemplo con ácido clorhídrico o ácido fosfórico e hidróxido sódico.

- 5 El PBS también se denomina PBS 10 mM porque la concentración de Na_2HPO_4 es 10 mM (PBS 1x 1 l). Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS): No hay una diferencia significativa entre PBS y DPBS, salvo que el DPBS tiene menos concentración de fosfato; la concentración de Na_2HPO_4 es 10 mM en PBS y 8,1 mM en DPBS y la concentración de KH_2PO_4 es 1,8 mM en PBS y 1,41 mM en DPBS.

Formas del producto

10

La composición de acuerdo con la invención está habitualmente en forma líquida lista para su uso; por lo tanto puede venderse en el mercado como líquido en un recipiente adecuado, en dosis únicas (por ejemplo, de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml o más, o en un volumen mayor (por ejemplo, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 1 litro, 10 litros).

- 15 La composición también puede adoptar formas adecuadas para facilitar la aplicación, por ejemplo en forma de gel para aplicar en la zona a tratar o en los tejidos que rodean el implante. Por lo tanto, en realizaciones particulares, la composición está en forma líquida, en forma de un gel, un barniz o un pulverizado.

- 20 En una realización particular, los elementos de la composición están en forma sólida, con todos los elementos de la composición juntos en un solo recipiente o en diferentes recipientes (por ejemplo, un vial) o en forma de comprimido sólido, en ambos casos, para reconstituirse justo antes de su uso. Para este fin, el producto comercial puede comprender los elementos de la composición en un recipiente/recipientes o en forma de comprimido y un volumen de agua en un recipiente, perfectamente medido para mezclarse con los elementos sólidos, logrando de esta manera las concentraciones de solución final especificadas en otras secciones de esta descripción. Adicionalmente, el agua puede
25 acidificarse o basificarse para obtener el pH deseado cuando se mezcla con los elementos de la composición.

El experto en la materia seleccionará de forma rutinaria las cantidades de los elementos de la composición para obtener una composición final que comprenda una solución salina basada en agua dependiendo de los volúmenes finales de la composición.

30

El término "recipiente" en el presente documento se usa para indicar cualquier receptáculo, que tiene un cierre que es adecuado para envasar una cantidad de dosis unitaria de una composición sólida o líquida. Se entenderá que las formas equivalentes de envasado, tales como un vial, una ampolla, una jeringuilla desechable, un cartucho de jeringuilla o una jeringuilla precargada, están abarcados por esta realización de la invención. Los recipientes deben
35 estar hechos de un material que conserve la estabilidad de los elementos de la composición para almacenarla preferentemente a temperatura ambiente, pero también refrigerada.

Un aspecto de la invención como se dijo anteriormente es un kit que comprende una composición como se definió anteriormente y un implante.

40

El término "implante" se entiende ampliamente como cualquier material o andamio para restaurar el hueso faltante, en parte o en su totalidad. El implante se entiende como sinónimo de prótesis. Dependiendo del material, los implantes usados en la ingeniería de tejidos óseos pueden clasificarse en implantes fabricados con metales y aleaciones (aleaciones de titanio, cobalto-cromo-molibdeno) e implantes no metálicos fabricados básicamente con cerámica, que
45 pueden ser cerámicas inertes (alúmina, carbono, circonio) y cerámicas bioactivas (vidrios y cerámicas bioactivas, fosfatos cálcicos e hidroxiapatita). Los implantes no metálicos también pueden estar hechos de polímeros.

Particularmente, el implante es un implante de metal. El implante de metal o la prótesis de metal pueden usarse cualquiera en odontología y traumatología. En una realización particular, el implante de metal es un implante dental.
50 Los implantes dentales suelen estar hechos de titanio con tolerancias muy específicas y precisas. Las aleaciones de titanio más importantes para aplicaciones clínicas son Ti-6Al-4V, Ti-3Al-2.5V y Ti-6Al-7Nb. Los implantes dentales también están hechos de óxido de circonio monolítico. Particularmente, el implante dental de metal es un implante dental de titanio.

- 55 En una realización particular, el implante está hecho de un biomaterial. Los biomateriales de reemplazo de tejido óseo disponibles que se usan comúnmente incluyen autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y aloplastos. Los aloinjertos proceden de un donante de la misma especie, que puede ser hueso fresco/congelado, liofilizado o hueso liofilizado desmineralizado. Los xenoinjertos se obtienen de otras especies y se usan ampliamente en aplicaciones clínicas de regeneración periodontal. Los materiales aloplásticos incluyen cerámicas y polímeros y son naturales o sintéticos.

- 60 Algunos ejemplos de aloplastos son vidrios bioactivos, fosfatos cálcicos (hidroxiapatita, fosfato tricálcico y otros fosfatos de calcio-brushita, monetita, polifosfatos cálcicos/CPP-) y sulfato cálcico. Algunos ejemplos particulares de injertos óseos disponibles en el mercado para aplicaciones reconstructivas óseas se describen en Sheikh Z, *et al.* "Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review" Biomater Res. 2017; 21: 9.

65

En una realización particular, el kit comprende el implante y la composición de la invención en partes separadas. Sin embargo, en una realización particular, la presentación comercial es el implante sumergido en la composición líquida en un recipiente. En una realización particular, el kit comprende además medios para aplicar la composición; dichos medios se explican en lo sucesivo en el presente documento.

5

La propuesta de la invención también puede ser útil para promover la regeneración ósea de zonas que no están en contacto con un implante pero con presencia de pérdida ósea. Algunos ejemplos de lo anterior son en caso de enfermedades periodontales. En algunos casos, el artículo de fabricación es solo la composición en forma líquida o en forma sólida, porque el profesional tiene a su disposición los demás elementos para preparar la composición y para

10

usar y aplicar la composición al paciente (por ejemplo, agua y medios de aplicación). No obstante, otro aspecto de la invención es un kit que comprende una composición de acuerdo con el primer aspecto y medios para aplicar la composición al área a tratar. Particularmente, los medios para aplicar la composición son una jeringuilla, una varilla de algodón y una gasa textil. En una realización particular, los medios son para aplicar la composición a la cavidad bucal.

15

Los medios preferidos para aplicar la composición en caso de peri-implantitis o periodontitis (es decir, que se necesita una aplicación en la bolsa ósea) son un protector bucal, también conocido como férulas oclusivas, protector bucal, pieza bucal, protector dental, protector de goma, protector de noche, férula de mordida o boca, o plano de mordida. Este es un aparato dental retirable para adaptarse a los arcos superiores o inferiores de los dientes.

20

En otra realización, también con el fin de facilitar el uso, el kit comprende además medios para añadir agua al recipiente con la composición en forma sólida. Los medios son preferentemente una jeringuilla equipada con una aguja perforadora desechable que se usa para sacar agua de su recipiente y colocarla en el recipiente con la composición en forma sólida.

25

Otro aspecto de la invención es el uso de los kits descritos anteriormente para su uso en la promoción de la osteogénesis.

Además de los elementos citados en esta descripción que conforman la solución basada en agua, la composición de la invención puede comprender elementos, vehículos o excipientes adicionales, adecuado para tener una composición biocompatible. Estos productos pueden adoptar la forma de un producto farmacéutico, un medicamento, un complemento alimenticio o un producto para el cuidado bucal.

30

El experto en la materia utilizará otras formas de presentación apropiadas a la composición de la invención, normalmente usadas en la industria farmacéutica y de reactivos químicos.

35

Aplicaciones de las composiciones y los kits

Como se ha analizado anteriormente, un aspecto de la invención se refiere a una composición bioactiva ósea como se describe anteriormente, para su uso en la promoción de la osteogénesis. Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de cualquiera de las composiciones de la invención para la fabricación de un producto farmacéutico, un medicamento, un complemento alimenticio o un producto para el cuidado bucal para promover la osteogénesis. Este aspecto también puede formularse alternativamente como un método para promover la osteogénesis que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones de la invención. Como alternativa, también puede formularse como el uso de una composición bioactiva ósea como se describe anteriormente, en la promoción de la osteogénesis. El mismo aspecto también puede formularse como un método para promover la osteogénesis usando una composición bioactiva ósea como se describe anteriormente.

40

Por lo tanto, la invención proporciona una composición bioactiva ósea para su uso como un medicamento.

45

En una realización particular, la composición bioactiva ósea se usa en la promoción de la osteogénesis cuando se usa un implante.

50

En una realización particular, el implante de metal es un implante dental de titanio. El uso de la composición o los kits de la presente invención favorece un injerto temprano del implante metálico, induciendo la formación más temprana del hueso alrededor del implante y, aumentando también la cantidad y la calidad del hueso formado. Además, el hueso formado es de mayor calidad. Todas las características anteriores contribuyen a un injerto más rápido y más fuerte del implante, así como a una reducción de la pérdida del implante. Sin las composiciones y kits de la invención, un implante dental tarda tres meses en injertarse correctamente, mientras que usando las composiciones y kits de la invención, el injerto se acelera enormemente y solo tarda 15 días. Esto representa una gran ventaja para el paciente y el médico.

55

Por tanto, las composiciones o kits de la presente invención se usan para mejorar el injerto de implantes metálicos (preferentemente implantes dentales de titanio).

60

Además, dado que la composición de la presente invención induce una osificación temprana y/o aumentada, también se ha encontrado útil en el tratamiento de enfermedades periodontales tales como periodontitis y peri-implantitis, dos enfermedades asociadas a infecciones bacterianas que afectan al tejido conectivo y al hueso dentario, conduciendo a la destrucción de los mismos y la pérdida de implantes o dientes, respectivamente. Dicha composición, debido a su capacidad para la generación ósea temprana, acelerada y aumentada, también es útil para promover la osteogénesis en el tratamiento de una enfermedad periodontal, tales como peri-implantitis y periodontitis. Esto puede formularse alternativamente como un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad periodontal, que comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de cualquiera de las composiciones de la invención. Notablemente, la composición bioactiva ósea es capaz de promover la osteogénesis por sí misma, sin presencia de un material como ocurre en la periodontitis.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición bioactiva ósea, para el tratamiento de la superficie de un implante metálico antes de la implantación.

- 15 El experto en la materia seleccionará los volúmenes apropiados de composición de acuerdo con la superficie y la afección a tratar. En una realización particular, la composición se aplica en la zona hasta el sangrado de dicha zona que significa que han emergido las células madre. En una realización particular, se aplican algunos mililitros de composición a la zona.
- 20 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Los objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción. Adicionalmente, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan en el presente documento con fines ilustrativos y sin pretender ser limitantes de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1. Análisis de expresión génica por RT-PCR de marcadores de diferenciación (OC, COL I, RUNX2, ALP e ITGα4) en la segunda semana de diferenciación celular. Se usó GAPDH como gen de mantenimiento. A: Disco de titanio Ti-6Al-4V (AB/AE) tratado con composición bioactiva ósea. B: Disco de titanio Ti-6Al-4V con fosfato cálcico (placa) tratado con composición bioactiva ósea.

FIGURA 2. Análisis por Q RT-PCR de marcadores osteogénicos (COL I, BMP2 y OCN) de DPPSC a los 21 días de diferenciación celular. Se usó GAPDH como gen de mantenimiento.

FIGURA 3. Actividad ALP. Análisis de la actividad de calcio de DPPSC y DPMSC a los días 3, 11 y 20 de diferenciación celular en discos de titanio tratados con composición bioactiva ósea. Se usó GAPDH como gen de mantenimiento.

FIGURA 4. Análisis de la actividad ALP de DPPSC y DPMSC a los días 3, 11 y 20 de diferenciación celular en discos de titanio tratados con composición bioactiva ósea. Se usó GAPDH como gen de mantenimiento.

FIGURA 5. Análisis histomorfométrico de conejos experimentales con grupo A a los 15, 30, 45 y 60 días.

FIGURA 6. Análisis histomorfométrico de conejos experimentales con grupo B a los 15, 30, 45 y 60 días.

FIGURA 7. Análisis histomorfométrico de conejos experimentales con grupo C a los 15, 30, 45 y 60 días.

FIGURA 8. Cuantificaciones de la formación de hueso nuevo de conejos experimentales con el grupo A, B y C a los 15, 30, 45 y 60 días.

FIGURA 9. Análisis por Q RT-PCR de marcadores osteogénicos (OC, OCN y ALP) de DPPSC en el día 7 de diferenciación celular en discos de titanio tratados. Se usó GAPDH como gen de mantenimiento. Expresión relacionada con discos sin tratamiento.

FIGURA 10. Procedimiento quirúrgico para el estudio *in vivo* en perro. A. Relleno de los 3 defectos óseos con biomaterial (Straumann®XenoGraft) y la composición bioactiva ósea. B: Área quirúrgica con membrana. C. Área quirúrgica con sutura 3/0. Esta figura está relacionada con el ejemplo 6.

FIGURA 11. Evolución del estudio *in vivo* en perro con Straumann® XenoGraft con la composición bioactiva ósea, 60 días después de la cirugía. A: Muestreo después de 60 días usando un trépano de 5 mm (la imagen inferior izquierda corresponde a 2 meses con solo Straumann® XenoGraft). B: Análisis RX. C: Análisis histológico. Esta figura está relacionada con el ejemplo 6.

FIGURA 12. Muestra de examen radiológico. Comparación entre control (sin biomaterial), Straumann® XenoGraft solo y Straumann® XenoGraft con composición bioactiva ósea (BBL), después de 2 meses de cirugía. Esta figura está relacionada con el ejemplo 5.

- 5 FIGURA 13. Estudio histológico. A. Grupo de prueba: Denum con composición bioactiva ósea (BBL). B. Grupo control: Denum solo. Esta figura está relacionada con el ejemplo 6.

- 10 FIGURA 14. SEM de diferenciación 3D de DPPSC en P4 usando un andamio de raíz dental humana durante 21 días en tejidos periodontales. Grupo DPPSC (A1, A2, A3) de superficie tratada con BBL. Después de 3 semanas de diferenciación, se produjeron en la muestra fibras de colágeno (flechas blancas), algunos vasos sanguíneos (flechas negras), tejido fibroso y algunas células parecidas a cementoblastos (flecha amarilla). Grupo control (B1, B2, B3) de tejido periodontal humano en diferentes aumentos (5000X, 15000X y 30000X). Grupo control (C1, C2, C3) donde no se muestra la presencia de células o tejidos. Esta figura está relacionada con el ejemplo 7.

- 15 FIGURA 15. Secciones de análisis histológico del grupo DPPSC (A2-3; B2-3; C2-3) comparando con el grupo control (A1, B1, C1) con 3 tintes diferentes: tinción de tricromo de Masson (A1, A2, A3); azul alciano (B1, B2, B3) y hematoxilina y eosina (H&E) (C1, C2, C3). El grupo DPPSC (A2-3; B2-3; C2-3) mostró la formación de fibras de colágeno (flechas negras) insertadas perpendicularmente en los tejidos similares al cemento, que se asemejaba a las fibras de Sharpey en contraste con los controles (A1, B1, C1). Esta figura está relacionada con el ejemplo 7.

20 Ejemplos

Ejemplo 1. Influencia de la composición bioactiva ósea en la expresión de marcadores óseos en cultivos celulares *in vitro*.

25 Aislamiento celular:

1. Cultivo en medio DPPSC

- 30 Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² con medio DPPSC que contiene como medio base 60 % de medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) - bajo en glucosa (Sigma, Estados Unidos) y 40 % de MCD-201 (Sigma, Estados Unidos) suplementado con 1x insulina-transferrina-selenio (en lo sucesivo en el presente documento, ITS; Sigma, Estados Unidos), 1x ácido linoleico-seroalbúmina bovina (en lo sucesivo en el presente documento, LA-BSA; Sigma, Estados Unidos), dexametasona 10⁻⁹ M (Sigma, Estados Unidos), ácido ascórbico 2-fosfato 10⁻⁴ M (Sigma, Estados Unidos), 100 unidades de penicilina 1000 unidades de estreptomycin (PAA, Life Technologies, EE.UU.), suero bovino fetal al 2 % (en lo sucesivo en el presente documento, FBS; Sigma, Estados Unidos), 10 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas humano BB (en lo sucesivo en el presente documento, hPDGF-BB; R & D Systems, Estados Unidos) y 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (en lo sucesivo en el presente documento, EGF; R & D Systems, Estados Unidos). Los matraces se cubrieron previamente con 10 ml de fibronectina 100 ng/ml (Life Technologies, EE.UU.) y se incubaron a 37 °C, concentración de CO₂ al 5 % durante 1 hora.

Durante las dos semanas de cultivo primario, el medio se cambió cada 3 días y la confluencia celular se mantuvo al 30 %, dado que mayores tasas de confluencia conducen a la maduración celular y cambios en la morfología y el genotipo.

2. Cultivo en medio DPMSC (en lo sucesivo en el presente documento, las células cultivadas en estas condiciones se denominan DPMSC)

- 50 Las células se cultivaron en un matraz de 75 cm² con medio DPMSC que contiene medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Biochrom, Reino Unido) suplementado con factor de crecimiento de fibroblastos básico 2 ng/ml (en lo sucesivo en el presente documento, bFGF) y FBS al 10 % (Hyclone, EE.UU.). Los matraces se cubrieron previamente con 10 ml de fibronectina 100 ng/ml (Life Technologies, EE.UU.) y se incubaron a 37 °C, concentración de CO₂ al 5 % durante 1 hora.

- 55 Las células se sembraron a densidad de 300.000 células/cm² y el medio se cambió cada tres días. La confluencia se estableció en 50-80 % para mantener la morfología celular y la multipotencia.

3. Cultivo en medio Saos (en lo sucesivo en el presente documento, las células cultivadas en estas condiciones se denominan células Saos)

- 60 Las células de subcultivo P 12 se sembraron a densidad de 500.000 células/cm² y el medio se cambió cada tres días. La confluencia se estableció al 80 %, se descongelaron y se sembraron en matraces de 75 cm² con medio Saos que contiene DMEM (Invitrogen, Estados Unidos), suplementado con FBS al 10 % ([Hyclone, EE.UU.]), 2 mm de L-glutamina (Sigma EE.UU.), penicilina 100 u/ml (Life Technologies, EE.UU.), estreptomycin 1000 u/ml (Life Technologies, EE.UU.). Los matraces se cubrieron previamente con 10 ml de fibronectina 100 ng/ml (Life

Technologies, EE.UU.) y se incubaron a 37 °C, concentración de CO₂ al 5 % durante 1 hora.

El medio se cambió cada tres días. Los subcultivos se realizaron cuando las células estaban al 80 % de confluencia.

5 Preparación de los implantes:

Para analizar la influencia de la composición bioactiva ósea de la presente invención en la interacción entre los cultivos celulares mencionados anteriormente y los implantes metálicos (de forma más precisa, implantes dentales de titanio), los discos de los implantes se prepararon y trataron como sigue:

- 10 Los discos de titanio se obtuvieron cortando una aleación de titanio disponible en el mercado Ti₆Al₄V (Ti-6Al-4V), también se obtuvieron otros discos de otras aleaciones de titanio, en particular Ti-6Al-4V Eli y Ti-5Al-2.5Sn. No hubo diferencias de comportamiento entre los discos. Los discos medían 2,0 mm de espesor y tenían un diámetro de 14,0 mm. A continuación, la superficie de dichos discos se chorreó con alúmina y se grabó con ácido (en adelante, AB/AE), lo que proporcionó rugosidad y aumentó la superficie del implante (disco). La forma de las sondas (ya sean
- 15 discos, placas o cualquier otra forma) no influye en los resultados.

Preparación de la composición bioactiva ósea:

- 20 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄, 0,80 g de MgCl₂, 1,20 g de CaCl₂ y 20 g de EDTA se disolvieron en 800 ml de agua. Después de que todos los componentes se disolvieron correctamente, el volumen de la solución se llevó a 1 l. Antes de poner en contacto los discos mencionados anteriormente con los cultivos celulares, los discos se trataron con 100 microlitros de la composición bioactiva ósea, incubados a temperatura ambiente (37 °C durante 1 día). Este tratamiento superficial se dividió en tres grupos: evaluación del tratamiento superficial el día 1, 1 mes de cultivo celular y sin tratamiento superficial.

25

Diferenciación de osteoblastos:

Para analizar la diferenciación de osteoblastos, se cultivaron las tres poblaciones de células anteriormente mencionadas, independientemente, en los discos de titanio. Las células se sembraron en discos de titanio de discos

- 30 Ti₆Al₄V (tratados como se mencionó anteriormente, es decir, discos AB/AE tratados e incubados o no con la composición bioactiva ósea de la presente invención) en placas de 24 pocillos a una densidad de 1x10³ células por cm². Para los diferentes tipos de células utilizados, las condiciones de cultivo para la diferenciación de osteoblastos fueron:
- 35 • DPPSC y DPMSC: Se usaron cinco DPPSC y DPMSC del mismo clon para la diferenciación ósea con medio osteogénico, que contenía; como medio base α-MEM (Gibco) y RPMI, suplementado con FBS al 10 %, β-glicerol fosfato 10 mM (Sigma, Estados Unidos), ácido L-ascórbico 50 mM (Sigma, Estados Unidos)), dexametasona 0,01 mM y solución al 1 % de penicilina/estreptomicina. La suspensión se colocó mediante la punta en matraces de 75 cm² incluyendo los discos de titanio con los diferentes tratamientos mencionados anteriormente. El medio
- 40 se cambió cada 3 días.
- Las células Saos se cultivaron en las mismas condiciones excepto por el medio, que era el mismo que se mencionó anteriormente para estas células.

- 45 Teniendo en cuenta las condiciones de cultivo celular anteriores, se generaron y se analizaron los siguientes grupos para ver si existían diferencias en la expresión de varios marcadores de osteodiferenciación, principalmente OC, COL I, RUNX-2, ALP e ITGα4. Como gen de mantenimiento, también se analizó la expresión de GAPFH:

- DPPSC cultivadas con disco de implante no tratado (es decir, sin la composición bioactiva ósea) y en condiciones
- 50 no diferenciadoras.
- DPMSC cultivadas con disco de implante no tratado (es decir, sin la composición bioactiva ósea) y en condiciones no diferenciadoras.
- Células Saos con disco de implante no tratado (es decir, sin la composición bioactiva ósea).
- DPPSC cultivadas con disco de implante no tratado (es decir, sin la composición bioactiva ósea) y en condiciones
- 55 de diferenciación de osteoblastos.
- DPMSC cultivadas con disco de implante no tratado (es decir, sin la composición bioactiva ósea) y en condiciones de diferenciación de osteoblastos.
- DPPSC cultivadas con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) y en condiciones no diferenciadoras durante 24 horas.
- 60 - DPMSC cultivadas con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) y en condiciones no diferenciadoras durante 24 horas.
- Células Saos con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) durante 24 horas.
- DPPSC cultivadas con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) y en condiciones de diferenciación de osteoblastos durante 24 horas.
- 65 - DPMSC cultivadas con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) y en condiciones

- de diferenciación de osteoblastos durante 24 horas.
- DPPSC cultivadas con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) y en condiciones no diferenciadoras durante 30 días.
 - DPMSC cultivadas con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) y en condiciones no diferenciadoras durante 30 días.
- 5
- Células Saos con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) durante 30 días.
 - DPPSC cultivadas con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) y en condiciones de diferenciación de osteoblastos durante 30 días.
 - DPMSC cultivadas con disco de implante tratado (es decir, con la composición bioactiva ósea) y en condiciones de diferenciación de osteoblastos durante 30 días.
- 10
- Hueso humano.
 - También se analizaron los mismos grupos sin disco de implante, es decir, cultivando las células con discos de placa de titanio cubiertos con fosfato cálcico (que provoca calcificación).
- 15 Para ver la expresión de ARN de los marcadores mencionados anteriormente, el ARN total se extrajo a los 1 y 30 días de diferenciación (y para los controles cuando se extrajo el ARN) usando Trizol (Invitrogen, Estados Unidos). La muestra se trató con DNasa (Promega, Estados Unidos) y, el ARN se aisló siguiendo las instrucciones del fabricante del Ultra-Clean™ Tissue & Cells RNA Isolation Kit (MoBio, Estados Unidos). Se trataron dos (2) mg de alícuotas de ARN con DNasa I (Invitrogen, Estados Unidos) y se sometieron a transcripción inversa usando el kit de síntesis de
- 20 ADNc Transcriptor First Strand (Roche, Suiza). La RT-PCR se realizó utilizando los cebadores de la siguiente Tabla 1 para la amplificación de OC, COL I, RUNX-2, ALP, ITGa4 y GAPDH.

GEN	Número de registro	CEBADOR DIRECTO (5'-3')	CEBADOR INVERSO (5'-3')	TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)	USO
ALP	NM_000478	GGACATGCAGTACGAGCTGA (SEQ ID NO: 1)	GTCAATTCTGCCTCCTTCCA (SEQ ID NO: 2)	133	RT-PCR
ALP	NM_000478	CCGTGGCAACTCTATCTTTGG (SEQ ID NO: 3)	GCCATACAGGATGGCAGTGA (SEQ ID NO: 4)	79	qRT-PCR
COL1	NM_000088	ACTGGTGAGACCCTGCGTGTA (SEQ ID NO: 5)	CAGTCTGCTGGTCCATGTA (SEQ ID NO: 6)	263	RT-PCR
COL1	NM_000088	CCCTGGAAGAATGGAGATGA T (SEQ ID NO: 7)	ACTGAAACC TCTGTGTCCTTCA (SEQ ID NO: 8)	139	qRT-PCR
OC	NM_199173	GTGCAGCCTTTGTGTCCAA (SEQ ID NO: 9)	GCTCACACACCTCCCTCCT (SEQ ID NO: 10)	129	RT-PCR
OC	NM_199173	AAGAGACCCAGGCGCTACC T (SEQ ID NO: 11)	AAC TCGTCACAGTCCGGATTG (SEQ ID NO: 12)	110	qRT-PCR
RUNX2	NM_00114603 8	TTACTGTGTCATGGCGGGTAAC (SEQ ID NO: 13)	GGTTCCCGAGGTCCATCTA (SEQ ID NO: 14)	220	RT-PCR
RUNX2	NM_00114603 8	AGCAAGGTTCAACGATCTGAG AT (SEQ ID NO: 15)	TTTGTGAAGACGGTTATGGTC AA (SEQ ID NO: 16)	81	qRT-PCR
ITGa4	NM_002204	TCCGAGTCAATGTCCACAGA (SEQ ID NO: 17)	GCTGGGCTACCCCTATTCTC (SEQ ID NO: 18)	88	RT-PCR qRT-PCR
GAPDH	NM_002046	CTGGTAAAGTGGATATTGTGCC AT (SEQ ID NO: 19)	TGGAATCATATTGGAACATGTAA ACC (SEQ ID NO: 20)	81	RT-PCR qRT-PCR

Dichas amplificaciones de RT-PCR se realizaron en gel de agarosa al 2 %. Los resultados se visualizaron bajo luz UV y se muestran en la FIGURA 1.

Además, la FIGURA 2 muestra los resultados de la expresión relativa para los genes COL I, BMP2 y OCN en los días 0 y 30.

BMP2 (proteína morfogenética ósea)	Directo	GCG GAA ACG CCT TAA GTC CA (SEQ ID NO: 21)	20
	Inverso	GTG GAG TTC AGA TGA TCA GC (SEQ ID NO: 22)	20
OCN	Directo	GCAGACCTGACATCCAGTAC (SEQ ID NO: 23)	57,7
	Inverso	TAATCTGGACTGCTTGTGGC (SEQ ID NO: 24)	57,7

Los cebadores usados para COL I fueron los mismos identificados en la Tabla 1.

10 La diferente expresión de genes mostrada en las Figuras 1 y 2 se correlaciona con el favorecimiento de la formación ósea. Además, cuando el implante se trata con la composición bioactiva ósea de la presente invención, la producción de hueso aumenta y la calidad del hueso producido es más alta.

15 Ejemplo 2. Influencia de la composición bioactiva ósea en la excreción de calcio y la actividad de la fosfatasa alcalina (en lo sucesivo en el presente documento, ALP) durante la formación ósea en cultivos celulares *in vitro*.

La concentración de calcio en el medio de cultivo celular (es decir, calcio secretado) se midió en DPPSC y DPMS C cultivadas con discos de implante tratados o no con composición bioactiva ósea en condiciones de diferenciación, de acuerdo con lo que se ha explicado anteriormente. Dicho calcio secretado está relacionado con la formación de hueso.

20 La concentración de calcio se midió analizando el sobrenadante de cada población celular en los días 3, 11 y 20 de diferenciación. El análisis se realizó usando un kit de ensayo colorimétrico de calcio (BioVision, Estados Unidos) a través de un complejo cromogénico ($\lambda = 575$ nm) formado entre iones calcio y 0-cresoltaleína. Este análisis proporciona una longitud de onda detectada a 575 nm y este valor determina la concentración de calcio.

25 Los resultados obtenidos para la concentración de calcio se resumen en la FIGURA 3. Puede verse que en el caso de cultivos celulares con discos de implante tratados con la composición bioactiva ósea, el pico de excreción de calcio puede verse antes (véase el aumento en el día 3), mostrando una formación más temprana del hueso.

30 En cuanto a ALP, un aumento de la actividad de dicha proteína también está relacionado con la formación de hueso. Por tanto, la actividad ALP se midió en el sobrenadante de los cultivos celulares mencionados anteriormente también en los días 3, 11 y 20. Dicha actividad se midió usando un kit de fosfatasa alcalina (BioSystems, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La absorbancia de cada muestra se midió a una longitud de onda de 405 nm en diferentes momentos (día 3, 11 y 20 durante la diferenciación celular) en los que se observa un aumento en la actividad de ALP en el grupo tratado frente al no tratado.

Los resultados obtenidos para la actividad ALP aparecen resumidos en la FIGURA 4. Una tendencia similar a la que se ve en la FIGURA 3 puede verse en la FIGURA 4, es decir, pico temprano en el día 3 de actividad de ALP que muestra formación ósea temprana.

40 Por lo tanto, los resultados obtenidos para la concentración de calcio y la actividad ALP se correlacionan perfectamente y son consistentes con una formación ósea temprana inducida por la composición bioactiva ósea de la presente invención.

45 Ejemplo 3. Influencia de la composición bioactiva ósea en el injerto de implante-hueso en conejos.

Para este estudio se utilizaron 60 implantes dentales divididos en tres grupos (n=20 por grupo). El tratamiento para cada uno de los tres grupos de estudio aparece descrito en la Tabla 2.

50 Tabla 2. Detalles del tratamiento adicional aplicado a los implantes en los diferentes grupos del estudio.

Grupo	Tratamiento de la superficie del implante
A	Sin tratamiento adicional
B	Composición bioactiva ósea del Ejemplo 1, pH ajustado a 7,4
C	Composición bioactiva ósea del Ejemplo 1, pH ajustado a 7,6

Los implantes se trataron mediante granallado con 50-100 μm de partículas de TiO_2 , seguido de limpieza ultrasónica con una solución alcalina Riozyme IV-E Neutro Gold (Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda, São Jose do Rio Preto, Brasil), se lavó con agua destilada y se decapó con ácido maleico ($\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CHOHCO}_2\text{H}$). Para los implantes usados en el grupo A, el anterior fue el único tratamiento que se aplicó. Para los grupos experimentales B y C: los implantes se trataron inicialmente usando el procedimiento anterior y después con la correspondiente composición bioactiva ósea usando 100 ml durante 1 h.

En este estudio se usaron quince conejos adultos de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) con aproximadamente $4,5 \pm 0,5$ kg. Se instalaron cuatro implantes por animal (2 por tibia). Los animales se sacrificaron 15, 30, 45 y 60 días después de la cirugía.

Para el análisis histomorfométrico, los bloques óseos de las tibias, con implantes insertados, se retiraron de cada animal, se fijaron en una solución de formaldehído al 10 % durante 7 días y se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol (60 %, 70 %, 80 % y 99 %) durante 24-56 h, como se describió anteriormente (Yang J *et al.* "Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture" *Dentomaxillofac Radiol* 2003 Jul;32(4):247-51). Posteriormente, las muestras se embebieron en resina Technovit 7200 VLC (Kultzer & Co., Wehrheim, Alemania) y, después del curado, las muestras se seccionaron usando un cortador metalográfico (Isomet 1000; Buehler, Alemania). Las muestras de disco se pulieron usando una secuencia de papel abrasivo (Metaserv 3000; Buehler, Alemania) a un espesor de $\sim 30 \mu\text{m}$ y se analizó mediante microscopía óptica (Nikon E200, Japón). El crecimiento óseo se midió con respecto a la plataforma del implante en el contacto del hueso con el pilar de cicatrización, de acuerdo con el esquema usando el software Image Tool, versión 5.02 para Microsoft Windows™. Dos investigadores diferentes realizaron las mediciones en momentos diferentes y se computó un promedio único de estos valores. Cuando los valores medidos eran muy diferentes, ambos investigadores repitieron las medidas.

Los resultados obtenidos se muestran en las FIGURAS 5, 6 y 7 correspondientes a los grupos A, B y C respectivamente.

Además, Se realizó un análisis histológico de las muestras para medir el contacto de hueso a implante (en lo sucesivo en el presente documento, BIC). Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de BIC para los tres grupos del estudio a los 15, 30, 45 y 60 días.

Tiempo de medición	GRUPO A BIC en % (media $\pm$ SD)	GRUPO B BIC en % (media $\pm$ SD)	GRUPO C BIC en % (media $\pm$ SD)
15 Días	53,8 $\pm$ 2,3	61,7 $\pm$ 1,1	68,92 $\pm$ 0,3
30 Días	56,24 $\pm$ 1,8	67,4 $\pm$ 1,8	69,35 $\pm$ 2,2
145 Días	60,45 $\pm$ 1,2	68,1 $\pm$ 1,6	70,34 $\pm$ 1,1
60 Días	68,29 $\pm$ 0,8	71,39 $\pm$ 1,1	73,89 $\pm$ 1,9

Como puede verse en las FIGURAS 5 a 7, los implantes estaban en contacto con hueso predominantemente cortical a lo largo de los hilos superiores en la región cortical, mientras que los hilos de la médula ósea estaban en contacto con el hueso recién formado o con la médula ósea normal. Se observó consistentemente una línea de demarcación entre el hueso recién formado y el tejido óseo viejo. En términos generales, a partir de dichas figuras puede verse que en los grupos B y C se induce una formación temprana de hueso (incluso más temprana y mayor en el último). Esta diferencia se mantuvo durante todo el período de tiempo experimental (es decir, hasta el día 60).

Además, a partir de la tabla 3 también es derivable un BIC más temprano y aumentado en los grupos B y C en comparación con el grupo A. Además, y sorprendentemente, como también se ve en las FIGURAS 5 a 7, el grupo C también mostró un aumento en todos los puntos de tiempo cuando se compara con el grupo B.

Finalmente, también se midió la cantidad de hueso nuevo formado a los 15, 30, 45 y 60 días.

Los resultados se resumen en la FIGURA 8 y son consistentes con lo que se ha analizado anteriormente. Puede observarse una formación más temprana de hueso en los grupos B y C (el grupo C muestra una formación de hueso aún mayor en el día 15 en comparación con el grupo B). Además, el grupo C es el único grupo que sorprendentemente mostró un aumento de hueso nuevo formado el día 60 (en dicho día, la cantidad de hueso formado en los grupos A y B había evolucionado para ser similar).

Ejemplo 4. Comparación entre tratamientos

8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , 0,24 g de KH_2PO_4 , 0,80 g de MgCl_2 , 1,20 g de CaCl_2 y 20 g de EDTA se disolvieron en 800 ml de agua.

Para analizar la capacidad osteogénica relativa de PBS, CaCl_2 , MgCl_2 y EDTA, DPPSC (1×10^3 células por cm^2) se sembraron en discos de titanio de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$.

- 5 Grupo 1: tratado con PBS (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , 0,24 g de KH_2PO_4 , disuelto en 800 ml de agua).
 Grupo 2: tratado con PBS+ CaCl_2 + MgCl_2 (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , 0,24 g de KH_2PO_4 , 0,80 g de MgCl_2 , 1,20 g de CaCl_2 disuelto en 800 ml de agua).
 Grupo 3: tratado con PBS+ CaCl_2 + MgCl_2 +EDTA (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , 0,24 g de KH_2PO_4 , 0,80 g de MgCl_2 , 1,20 g de CaCl_2 y 20 g de EDTA se disolvieron en 800 ml de agua):
 10 Grupo 4: tratado con PBS+EDTA (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , 0,24 g de KH_2PO_4 y 20 g de EDTA se disolvieron en 800 ml de agua).

Control: Discos sin tratar.

- 15 Los discos se trataron e incubaron durante una hora antes de sembrar las células en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^3 células por cm^2 . Se realizó RT-PCR en el día 7 de la diferenciación de osteoblastos usando OC, OCN y ALP. Las diferencias de expresión mostradas en la FIGURA 9 muestran que los discos de titanio tratados con PBS con la adición de CaCl_2 y MgCl_2 presentan mayor capacidad osteogénica en comparación con el tratamiento con
 20 solo PBS o PBS+EDTA y que la combinación de PBS, CaCl_2 , MgCl_2 y EDTA muestra una capacidad osteogénica aún más sorprendente en comparación con los otros tratamientos.

Los valores de la FIGURA 9 se expresan como expresión relacionada con discos no tratados en el día 7.

- 25 También se probaron dos PBS comerciales y los resultados fueron similares a los del PBS usado en el Grupo 1 anteriormente mencionado. Dichos PBS comerciales fueron: Sigma Aldrich P3813 SIGMA - Solución salina tamponada con fosfato (Contenido de una bolsa, cuando se disuelve en un litro de agua destilada o desionizada, producirá solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (NaCl 0,138 M; KCl- 0,0027 mM); pH 7,4, a 25 °C).
 Thermo Fisher n.º de cat 18912 - Comprimidos de PBS. (Fosfato (como fosfatos sódicos) 10,0 mM, Cloruro potásico
 30 (KCl), 2,68 mM, Cloruro sódico (NaCl) 140,0 mM, a disolver con 500 ml de agua destilada).

Ejemplo 5. Aplicación de la composición

- Aplicación de la composición en un paciente cuando se usa un implante: Para la colocación de implantes usando la
 35 composición bioactiva ósea, la secuencia de fresado del hueso debe seguir las recomendaciones del fabricante, posteriormente la colocación del implante y con una inserción muy baja entre 20 y 50 Newtons. Esto es aplicable tanto para implantes dentales como para implantes de traumatología.

- Aplicación de la composición en un paciente con periodontitis o peri-implantitis: Para el tratamiento de la periodontitis
 40 utilizando la composición bioactiva ósea, en primer lugar debe realizarse el tratamiento periodontal convencional; retirar la placa bacteriana y el tejido de granulación mediante raspados supragingivales y subgingivales. En la misma intervención, el área del defecto óseo debe estar bien seca antes de aplicar la composición bioactiva ósea usando un cepillo convencional; después de eso, se provoca sangrado hasta que se forma el coágulo. Este proceso debe realizarse más de una vez hasta recuperar todo el hueso perdido.

- 45 Ejemplo 6. Estudio *in vivo* de la influencia de la composición ósea bioactiva en el uso de biomateriales en perro

Materiales y métodos.

50 *Animales*

- Para este estudio se usó una perra de 3 años con un peso de 12 kg. Un especialista en cirugía veterinaria observó al animal. El Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universidad de Murcia aprobó el protocolo de estudio que siguió las directrices establecidas por la Directiva del Consejo de la Unión Europea del 1 de febrero de
 55 2013/53/CEE.

Diseño del estudio

- El estudio se diseñó como una prueba *in vivo*. La extracción dental de todos los molares posteriores superiores e
 60 inferiores se realizó tres meses antes del estudio con composición bioactiva ósea y biomateriales. Después de eso, se realizaron 12 defectos óseos usando un trépano de 5 mm, 3 en cada zona:

- 3 defectos para probar Straumann® XenoGraft solo,
- 3 para composición bioactiva ósea con Straumann® XenoGraft,
- 65 - 3 defectos para Dentum y

- 3 para Dentum con composición bioactiva ósea.

5 Straumann® XenoGraft es un hueso bovino y una tasa de reabsorción lenta similar al hueso humano con baja cristalinidad, alta porosidad y un equilibrio óptimo de calcio y fosfato diseñado para lograr un volumen óseo confiable en la regeneración ósea guiada.

10 Dentum se usa en esta descripción para nombrar un biomaterial formado por dentina autóloga. La dentina autóloga se utiliza en los procedimientos clínicos como autoinjerto por su composición casi idéntica a la del hueso humano en iones de calcio y fósforo organizados como hidroxiapatita y TCP. Dentum se obtuvo usando el Smart Dentin Grinder (distribuido por Bioner, España, de KometaBio, EE.UU.). Los dientes extraídos del perro, después de limpiarse y secarse, se molieron inmediatamente con el Smart Dentin Grinder. Las partículas dentales que se obtuvieron fueron de 300-1200 µm, que posteriormente se tamizaron a través de un sistema especial de clasificación de dos compartimentos. Las partículas de los dientes se sumergieron en un limpiador de alcohol básico en un recipiente estéril para disolver todos los desechos orgánicos y bacterias durante 15 minutos. A continuación, las partículas se lavaron con solución salina estéril durante 5 minutos y se secaron.

El control de RX y aporque de las zonas quirúrgicas se realizó después de 15 días y 2 meses de cirugía (FIGURA 10).

Procedimiento quirúrgico

20 El perro recibió una medicación preanestésica que consistía en atropina 0,01 mg/kg (Atropinsulfat, Braun, B. Braun Melsungen, Melsungen, Alemania), clorhidrato de ketamina 20 mg/kg (Ketamin al 10 %, Essex, Munich, Alemania) y xilacina 0,1 mg/kg (Rompun, Bayer Vital, Leverkusen, Alemania) por vía intramuscular, seguido de 2 a 4 mg/kg de propofol por vía intravenosa (Propofol 1 % MCT Fresenius, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemania) para inducir la anestesia. El mantenimiento de la anestesia después de la intubación traqueal se realizó mediante la aplicación de isoflurano con una concentración espiratoria final del 1,8 % en oxígeno/aire y un bolo de 0,002 mg/kg/hora de citrato de fentanilo (Fentanyl-Janssen, Janssen-Cilag, Neuss, Alemania) seguida de una infusión continua de 0,001 mg/kg/hora de citrato de fentanilo. Para reducir el dolor postoperatorio, se indujo analgesia aplicando carprofeno subcutáneo (Rimadyl, Pfizer, Karlsruhe, Alemania) 4 mg/kg cada 24 horas durante 4 días, comenzando con la primera dosis después de la inducción de la anestesia. Para sacrificar los animales, una inyección intravenosa de tiopental 30 50 mg/kg (Trapanal, Nycomed, Konstanz, Alemania) y cloruro potásico 2 mmol/kg al 7,45 % (B. Braun, Melsungen, Alemania).

Evaluación histológica

35 Después del sacrificio, se obtuvieron muestras y se fijaron en una solución de formaldehído al 4 % (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 5-7 días. Después de eso, las muestras se deshidrataron en una serie de etanol al 70 %, 80 %, 90 % y 100 %, manteniendo 24 horas en cada concentración de etanol y desgrasando en xileno durante 24 horas (Merck, Darmstadt, Alemania). Para cortar las muestras, se infiltraron, se embebieron y se polimerizaron en Technovit 40 9100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemania) siguiendo el manual de instrucciones. Los cortes obtenidos se cortaron a 500 µm con una sierra de diamante rotativa de baja velocidad (Microslice, Metals Research, Cambridge, RU). Las secciones se colocaron en portaobjetos acrílicos opacos (Maertin, Friburgo, Alemania) y el espesor se redujo a los 60 µm finales mediante una placa de molienda giratoria (Stuers, Ballerup, Dinamarca). Para análisis histológico e histométrico, se usó microscopía de luz incandescente y polarizada y análisis de imágenes basado en PC para la 45 evaluación de la densidad ósea.

Resultados:

50 Se detectó homogeneidad del tejido óseo y el biomaterial con la composición bioactiva ósea en comparación con el área de control sin composición bioactiva ósea. El hueso cortical que consiste en osteones primarios y secundarios estaba completamente formado. Además, los grupos tratados tenían osteoblastos y osteocitos más maduros en comparación con los controles (FIGURA 11).

55 En el tejido óseo recién formado, pudieron detectarse osteocitos dentro de las lagunas. Se formó hueso nuevo integrando el biomaterial y el hueso original en la zona del defecto con una conexión firme. (FIGURAS 11, 12 y 13). La FIGURA 13 muestra que en (A) el defecto óseo se ha regenerado en un 80 % en el grupo de prueba (Dentum + composición bioactiva del hueso (BBL)) debido al crecimiento del tejido óseo en detrimento del crecimiento del tejido conectivo - fibroblastos. En (B) solo con Dentum, la regeneración del defecto es en un 40 % y puede observarse una presencia extensa de tejido conectivo - no deseable -.

Ejemplo 7. Estudio *in vivo* de la influencia de la composición ósea bioactiva en periodontitis.

Procesamiento de muestras dentales

65 Se limpiaron dientes humanos (n=13) y se eliminaron las coronas. Se obtuvieron secciones transversales después de

cortar las raíces. Los bloques dentales se limpiaron usando un protocolo previamente descrito (Galler KM, *et al.* "Bioengineering of dental stem cells in a PEGylated fibrin gel" Regen Med. 2011, 6(2):191-200). Las raíces se lavaron después 3 veces en PBS estéril y después se sumergieron de nuevo en EDTA 0,5 M durante 10 min, seguido de 3 enjuagues más en BBL. En lo sucesivo las raíces se mantuvieron incubadas con DPPSC para diferenciación periodontal durante 21 días.

Diferenciación del tejido periodontal en la superficie del diente

Las secciones transversales de los dientes se colocaron en placas de cultivo de 6 pocillos, las DPPSC se sembraron a 20000 células por pocillo en 4 ml de medio osteogénico y se incubaron a 37 °C durante 3 semanas. El medio osteogénico consiste en α - MEM (Gibco) que contiene un FBS 10 % de (Biochrom) inactivado por calor, β -glicerol fosfato 10 mM (Sigma-Aldrich), 50 μ M de ácido L ascórbico (Sigma-Aldrich), solución de dexametasona 0,01 mM y penicilina/estreptomicina 1X. El medio se cambió cada 3 días durante un período de 21 días.

15 *Análisis de microscopía electrónica de barrido*

Después de 3 semanas de cocultivar las células, las láminas dentales se procesaron para SEM. Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2,5 % (Ted Pella Inc.) en tampón de codilato de Na-ca 0,1 M EMS, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) (pH 7,2) durante 1 hora en hielo. Después de la fijación, las muestras se trataron con tetróxido de osmio al 1 % (OsO₄) durante 1 hora. A continuación, las muestras se deshidrataron en soluciones seriadas de acetona (30-100 %) con los andamios montados sobre soportes de aluminio. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de barrido Zeiss 940 DSM.

Análisis histológico

25 Los dientes que se cultivaron durante 21 días, se fijaron con formalina al 10 % durante 24 horas y después se llevaron al departamento de Anatomía Patológica del Instituto Universitario Dexeus (Barcelona, España). Las muestras recogidas se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones de 4 mm de espesor. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), Azul alciano y tricromo de Masson para determinar la formación de nuevas fibras de colágeno, vasos sanguíneos y células parecidas a cementoblastos. Se usó un sistema de análisis de imágenes (Image-Pro PlusTM, Media Cybernetic, SilverSprings, MD).

Resultados

35 *Cultivo celular de DPPSC/diferenciación de tejido periodontal*

Después de que se cultivaron las células *in vitro* durante 21 días, los andamios sembrados con células se sometieron a examen con microscopio electrónico de barrido (MEB). MEB en diferentes aumentos (5000X, 15000X y 30000X) en raíces con cemento mostró una masa celular de alta densidad en la superficie de la raíz para todas las muestras de DPPSC (FIGURA 14 A1, A2, A3), lo que indica que las células se adhirieron y crecieron favorablemente. Después de 3 semanas de diferenciación, MEB permitió obtener imágenes de alta resolución de la integración del tejido fibroso de las fibrillas de colágeno con las matrices de la raíz. Se produjeron algunos vasos sanguíneos y algunas células parecidas a cementoblastos en las muestras del grupo DPPSC tratadas con BBL que se compararon con el control positivo (tejido periodontal humano) (FIGURA 14 B1, B2, B3) y con control negativo (superficie dentaria sin ligamento periodontal) (FIGURA 14 C1, C2, C3), donde no hubo presencia de células ni tejidos.

Evaluación histológica de las raíces de los dientes

50 El análisis histológico utilizando tinción nuclear de secciones no descalcificadas apoyó aún más los descubrimientos de MEB. Para visualizar la formación temprana de grupos de células, se emplearon tinción de tricromo de Masson (FIGURA 15 A1, A2, A3); Azul alciano (FIGURA 15, B1, B2, B3) y hematoxilina y eosina (H&E) (FIGURA 15 C1, C2, C3). El corte histológico del grupo DPPSC (FIGURA 15 A2-3; B2-3; C2-3) mostró la formación de fibras de colágeno insertadas perpendicularmente en los tejidos similares al cemento, que se asemejaba a las fibras de Sharpey en contraste con el grupo control (FIGURA 15 A1, B1, C1). Un aumento más alto (FIGURA 15 A3, B3, C3) reveló la homogeneidad de las fibras de colágeno reparadoras recién formadas que se adhirieron bien a las superficies a los 21 días.

60 Los resultados experimentales muestran, debido al uso de la composición bioactiva ósea, una calcificación mejorada de las células parecidas a cementoblastos junto con una recuperación de las fibrillas de colágeno del ligamento periodontal, que es el principal defecto de la periodontitis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografía de patentes

65

US20070213832 (Wen Hai B)

Bibliografía no de patentes

- 5 Albrektsson T, *et al.* "Osseointegrated titanium implants Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-toimplant anchorage in man" Acta Orthop Scand 1981,52:155-170

Anselme K "Osteoblast adhesion on biomaterials" Biomaterials 2000,21:667
- 10 Galler KM, *et al.* "Bioengineering of dental stem cells in a PEGylated fibrin gel" Regen Med. 2011, 6(2):191-200

García AJ "Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions" Biomaterials 2005,26:7525
- 15 Howlett CR, *et al.* "Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture" Biomaterials 1994,15:213

Kilpadi KL, *et al.* "Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel" J Biomed Mater Res 2001,57:258
- 20 Lindahl C. "Biomimetic deposition of hydroxyapatite on titanium implant materials" Uppsala Univ. 1 de enero de 2012, páginas 978-91

Lindberg F. *et al.*, "Hydroxylapatite growth on single crystal rutile substrates" Biomaterials, Elsevier Science Publishers BV, Barking GB, vol. 29, n.º 23, 1 de agosto de 2008 páginas 3317-23 Mohan S, *et al.* "Bone growth factors" Clin Orthop Relat Res 1991,263:30-48
- 25 Scotchford CA, *et al.* "Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-interactions. II: Protein adsorption and early cell interactions" Biomaterials 2003,24:1147
- 30 Sheikh Z, *et al.* "Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review" Biomater Res. 2017; 21: 9.

Steele JG, *et al.* "Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment" J Biomater Sci Polym Ed 1993,5:245 Urist MR, *et al.* "Bone cell differentiation and growth factors" Science 1983,220:680-686
- 35 Wozney JM, *et al.* "Growth factors influencing bone development" J Cell Sci Suppl 1990,13:149-156
- 40 Yang J *et al.* "Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture" Dentomaxillofac Radiol 2003 Jul,32(4):247-51

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> BIOINTELLIGENCE SYSTEMS S.L.

<120> Composición bioactiva ósea y usos de la misma

<130> PD10139PC00
- 50 <160> 24

<170> PatentIn versión 3.5
- 55 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> Cebador directo ALP_1
<400> 1
ggacatgcag tacgagctga 20
- 65 <210> 2

	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador inverso ALP_1		
	<400> 2		
10	gtcaattctg cctcctcca	20	
	<210> 3		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador directo ALP_2		
	<400> 3		
20	ccgtggcaac tctatcttg g	21	
	<210> 4		
	<211> 20		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso ALP_2		
30	<400> 4		
	gccatacagg atggcagtga	20	
	<210> 5		
	<211> 20		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador directo COL1_1		
40	<400> 5		
	actggtgaga cctgcgtga	20	
	<210> 6		
45	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador inverso COL1_1		
	<400> 6		
	cagtctgctg gtccatgta	19	
55	<210> 7		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador directo COL1_2		
	<400> 7		
65	ccctggaag aatggagatg at	22	

	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador inverso COL1_2	
	<400> 8	
10	actgaaacct ctgtgtccct tca	23
	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo OC_1	
	<400> 9	
20	gtgcagcctt tgtgtccaa	19
	<210> 10	
	<211> 19	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso OC_1	
30	<400> 10	
	gctcacacac ctccctct	19
	<210> 11	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador directo OC_2	
	<400> 11	
	aagagacca ggcgtacct	20
45	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador inverso OC_2	
	<400> 12	
55	aactcgtcac agtccggatt g	21
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador directo RUNX2_	
	<400> 13	
65	ttactgtcat ggcgggtaac	20

	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso RUNX" _1	
10	<400> 14	
	ggttcccgag gtccatcta	19
	<210> 15	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo RUNX2_2	
20	<400> 15	
	agcaagggtc aacgatctga gat	23
	<210> 16	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador inverso RUNX2_2	
	<400> 16	
	ttgtgaaga cggttatggt caa	23
35	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador directo ITGa4	
	<400> 17	
45	tccgagtcaa tgtccacaga	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso ITGa4	
	<400> 18	
55	gctgggctac cctattcctc	20
	<210> 19	
	<211> 25	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo GAPDH	
65	<400> 19	

	ctggtaaagt ggatattggt gccat	25
	<210> 20	
	<211> 26	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador inverso GAPDH	
	<400> 20	
	tggaatcata ttggaacatg taaacc	26
	<210> 21	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador directo BMP2	
	<400> 21	
	gcggaaacgc ctaagtcca	20
25	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador inverso BMP2	
	<400> 22	
35	gtggagtca gatgatcagc	20
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador directo OCN	
	<400> 23	
45	gcagacctga catccagtac	20
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso OCN	
55	<400> 24	
	taatctggac tgcttggtgc	20

REIVINDICACIONES

1. Composición bioactiva ósea que comprende:
 - 5 una solución salina basada en agua para su uso en la promoción de la osteogénesis, en donde la solución de sal basada en agua comprende hidrogenofosfato disódico en una concentración de 8 a 12 mM en la solución, cloruro sódico en una concentración de 130 a 140 mM en la solución, hidrogenofosfato potásico en una concentración de 1,4 a 2,2 mM en la solución y cloruro potásico en una concentración de 2,3 a 3,1 mM en la solución; y en donde el pH de la composición está entre 7,0 y 7,8.
 - 10 2. Composición bioactiva ósea para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución comprende además una sal de calcio y una sal de un metal divalente diferente del calcio.
 3. Composición bioactiva ósea para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la sal de calcio está en una concentración de 7 a 15 mM en la solución y la sal de un metal divalente diferente del calcio está en una concentración de 2 a 12 mM en la solución.
 - 15 4. Composición bioactiva ósea para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la sal de calcio es cloruro cálcico y la sal de un metal divalente diferente del calcio es cloruro magnésico.
 - 20 5. Composición bioactiva ósea para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la solución comprende además un agente quelante, tal como EDTA.
 6. Composición bioactiva ósea para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la concentración de EDTA en la composición es de 25 mM a 100 mM.
 7. Composición bioactiva ósea para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en la promoción de la osteogénesis cuando se usa un implante, particularmente un implante dental de titanio.
 - 30 8. Composición bioactiva ósea para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en la promoción de la osteogénesis en el tratamiento de una enfermedad periodontal.
 9. Composición bioactiva ósea que comprende una solución salina basada en agua que comprende hidrogenofosfato disódico en una concentración de 8 a 12 mM en la solución, cloruro sódico en una concentración de 130 a 140 mM en la solución, hidrogenofosfato potásico en una concentración de 1,4 a 2,2 mM en la solución, cloruro potásico en una concentración de 2,3 a 3,1 mM en la solución, una sal de calcio en una concentración de 7 a 15 mM en la solución, una sal de un metal divalente diferente del calcio en una concentración de 2 a 12 mM en la solución y un agente quelante, en donde el pH de la composición está entre 7,0 y 7,8.
 - 35 10. Composición bioactiva ósea de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la sal de calcio es cloruro cálcico y la sal de un metal divalente diferente del calcio es cloruro magnésico.
 11. Composición bioactiva ósea de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende hidrogenofosfato disódico 10 mM, cloruro sódico 137 mM, hidrogenofosfato potásico 1,8 mM, cloruro potásico 2,7 mM, cloruro magnésico 8,4 mM, cloruro cálcico 10,81 mM y EDTA 68,4 mM.
 - 45 12. Kit que comprende la composición bioactiva ósea como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9-11 y un implante.
 13. Kit que comprende la composición bioactiva ósea como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9-11 y medios para aplicar la composición.
 - 50 14. Composición bioactiva ósea de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, para su uso en la promoción de la osteogénesis.
 - 55 15. Un implante que comprende la composición bioactiva ósea como se define en la reivindicación 1, en donde la solución salina basada en agua se usa para promover la osteogénesis.

FIG. 1

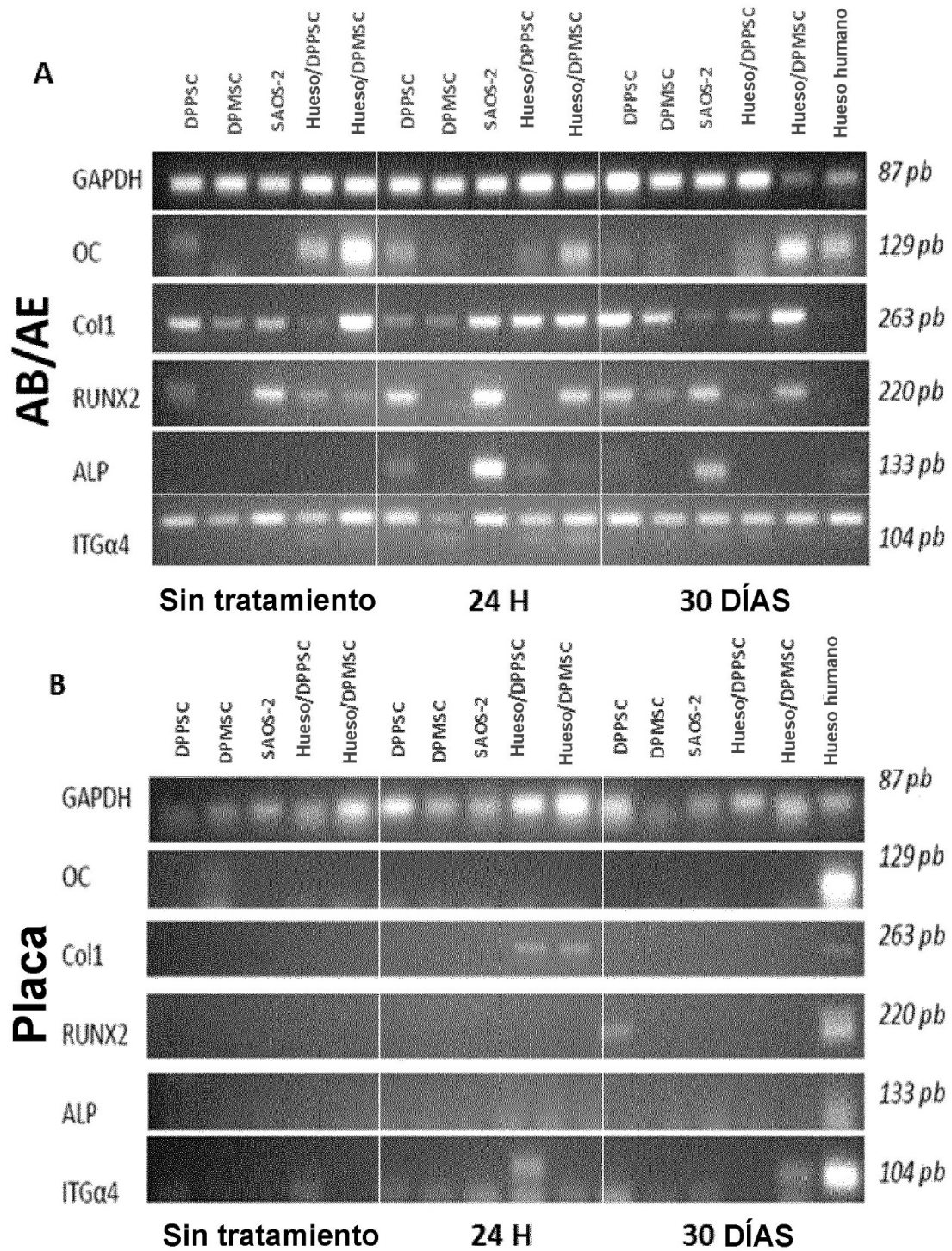


FIG. 2

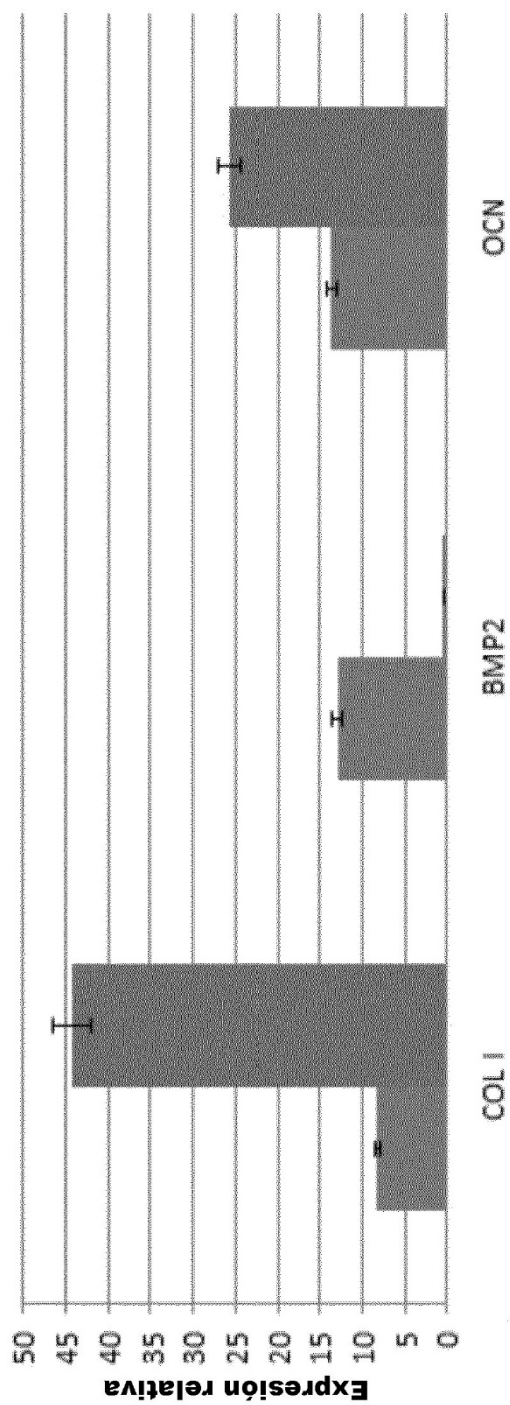


FIG. 3

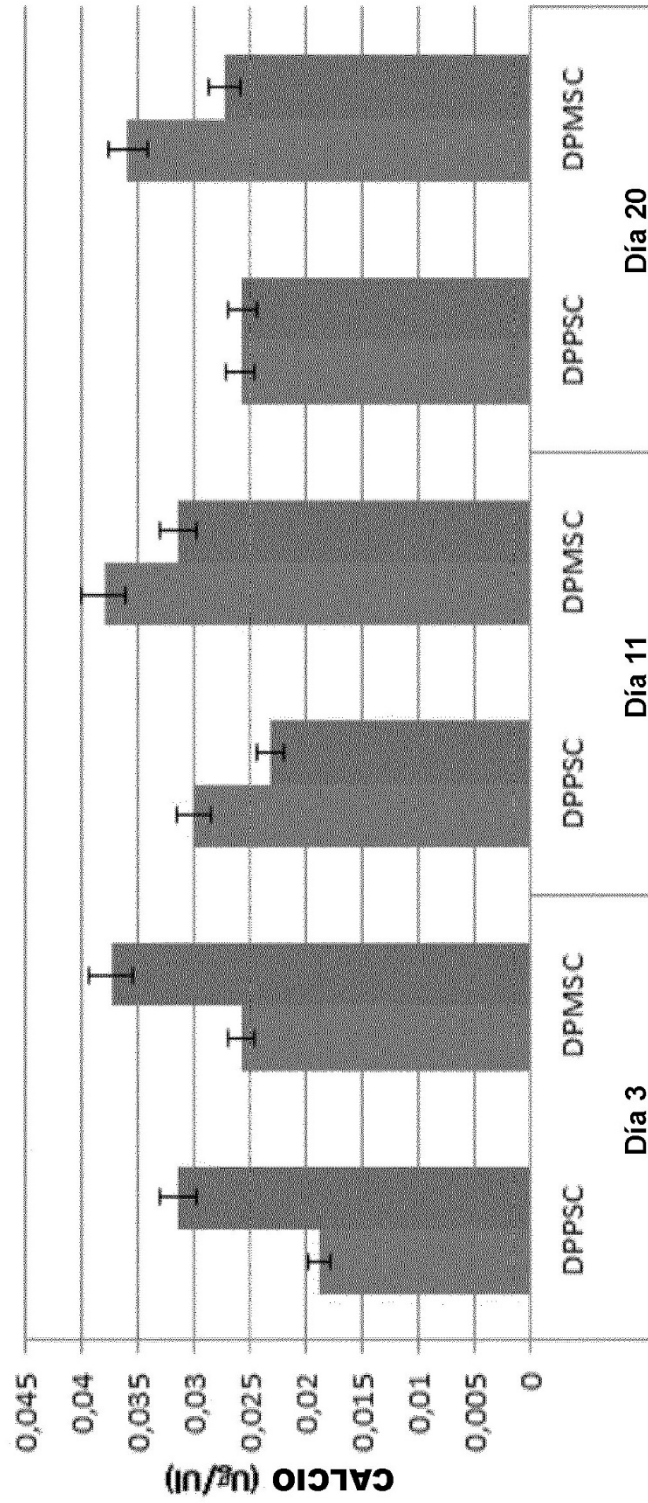


FIG. 4

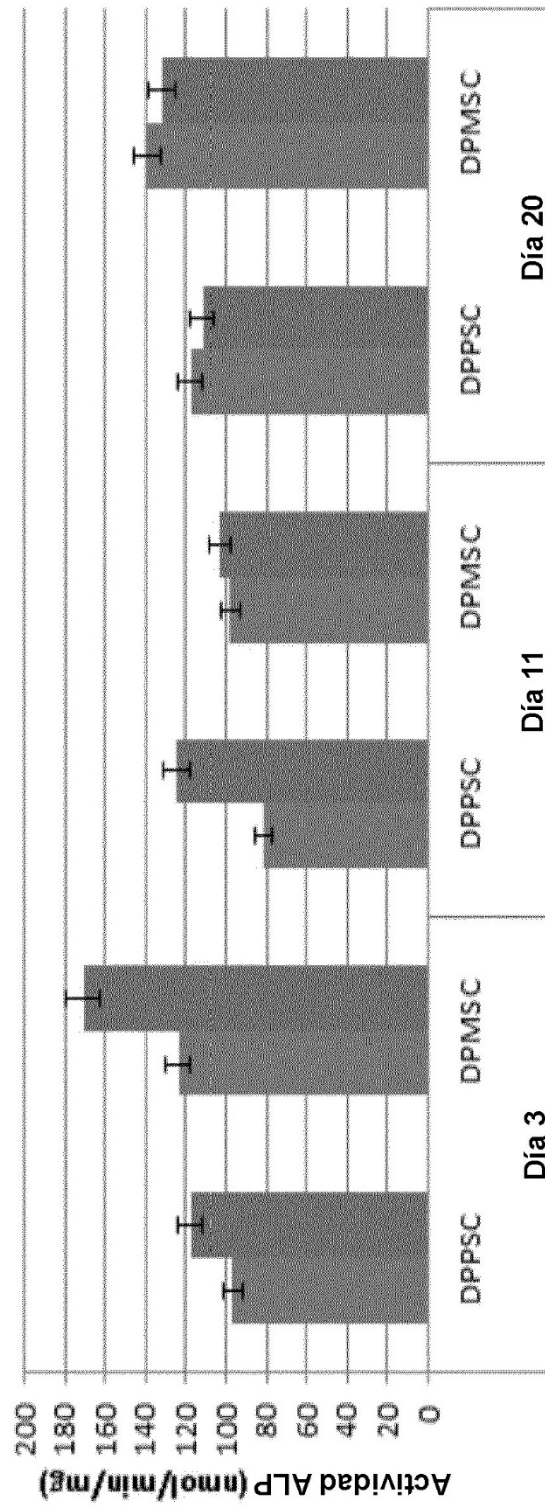
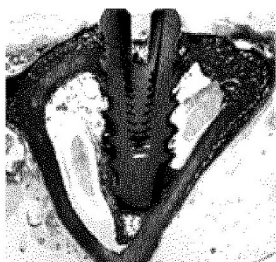
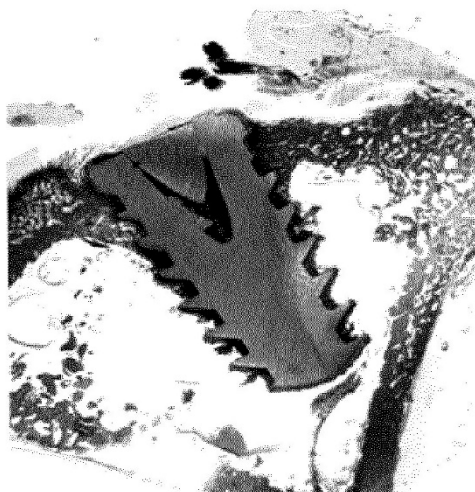


FIG. 5



GRUPO A: SUPERFICIE NO TRATADA.

15 DÍAS



30 DÍAS



45 DÍAS



60 DÍAS

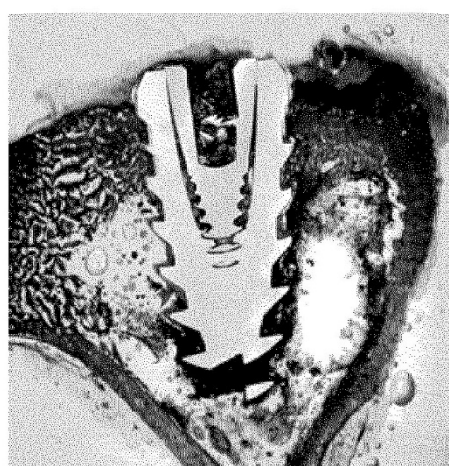


FIG. 6

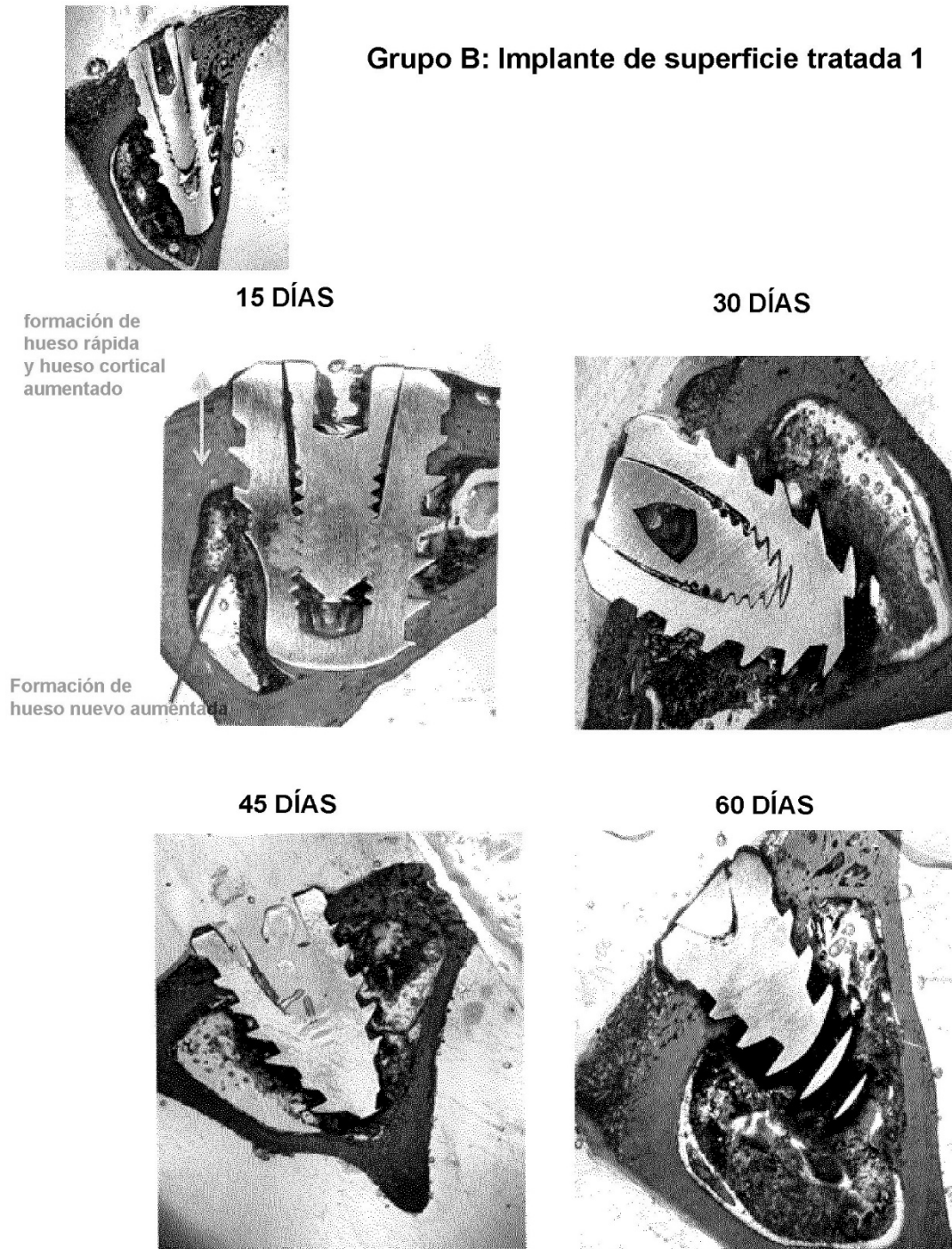
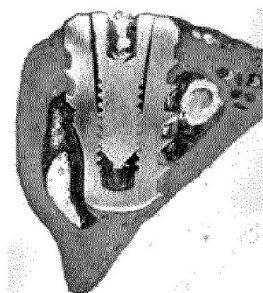


FIG. 7

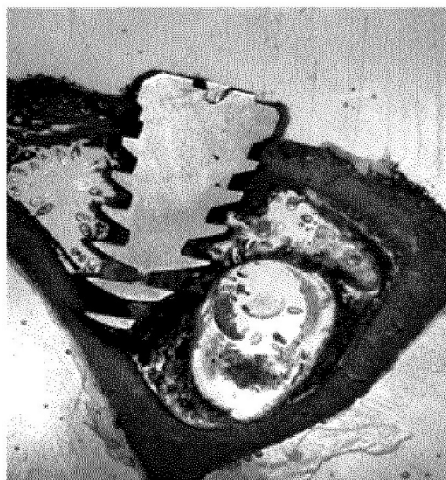


Grupo C: Implante de superficie tratada 2

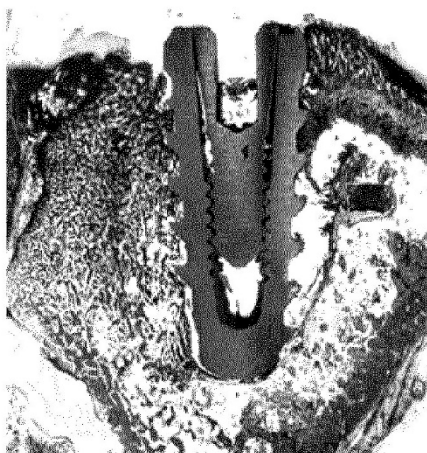
15 DÍAS



30 DÍAS



45 DÍAS



60 DÍAS



FIG. 8

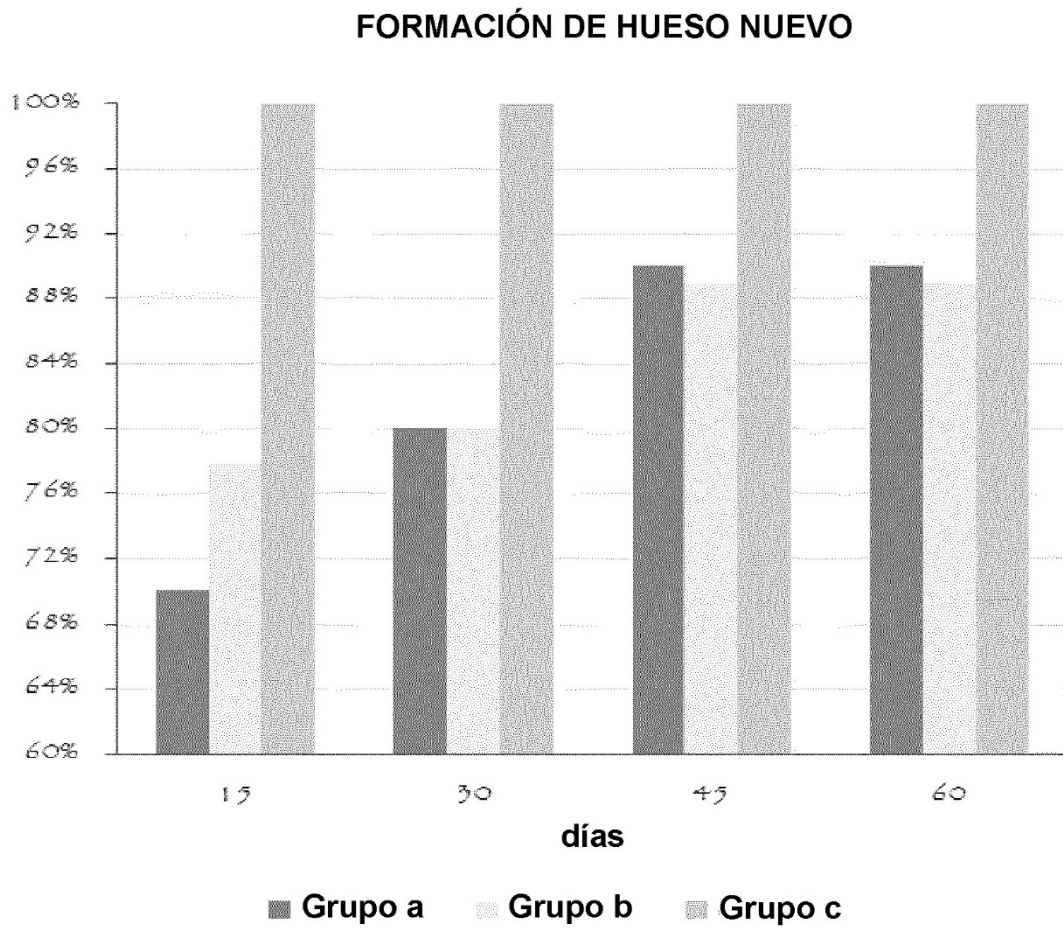


FIG. 9

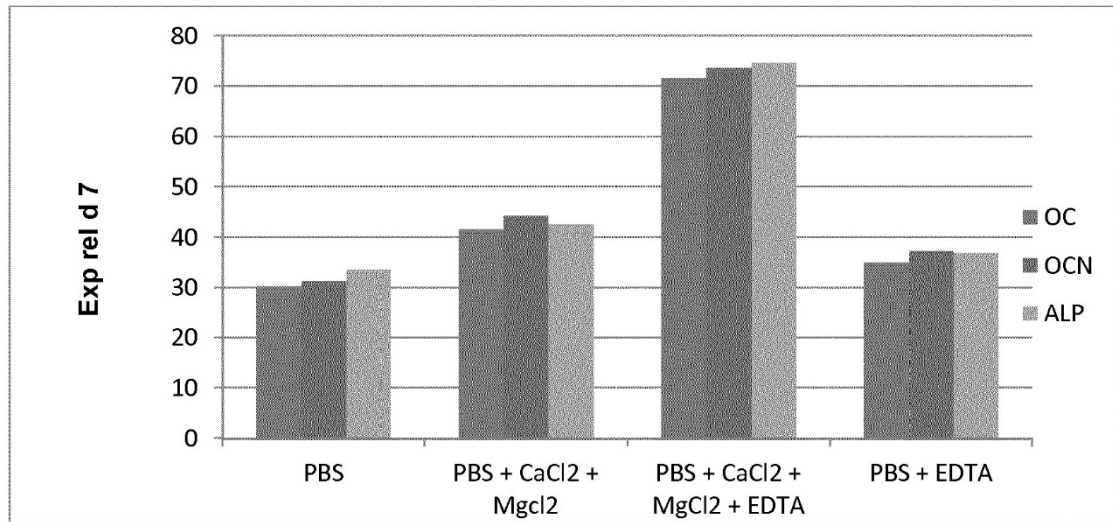


FIG. 10

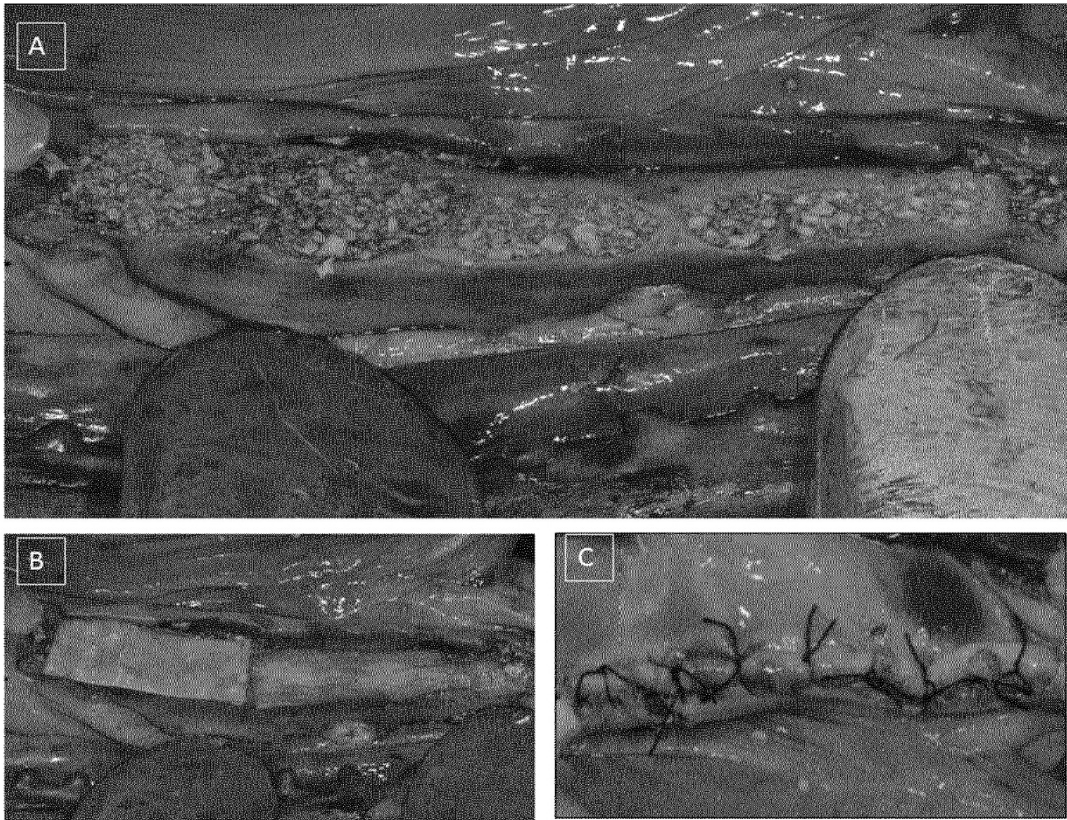


FIG. 11

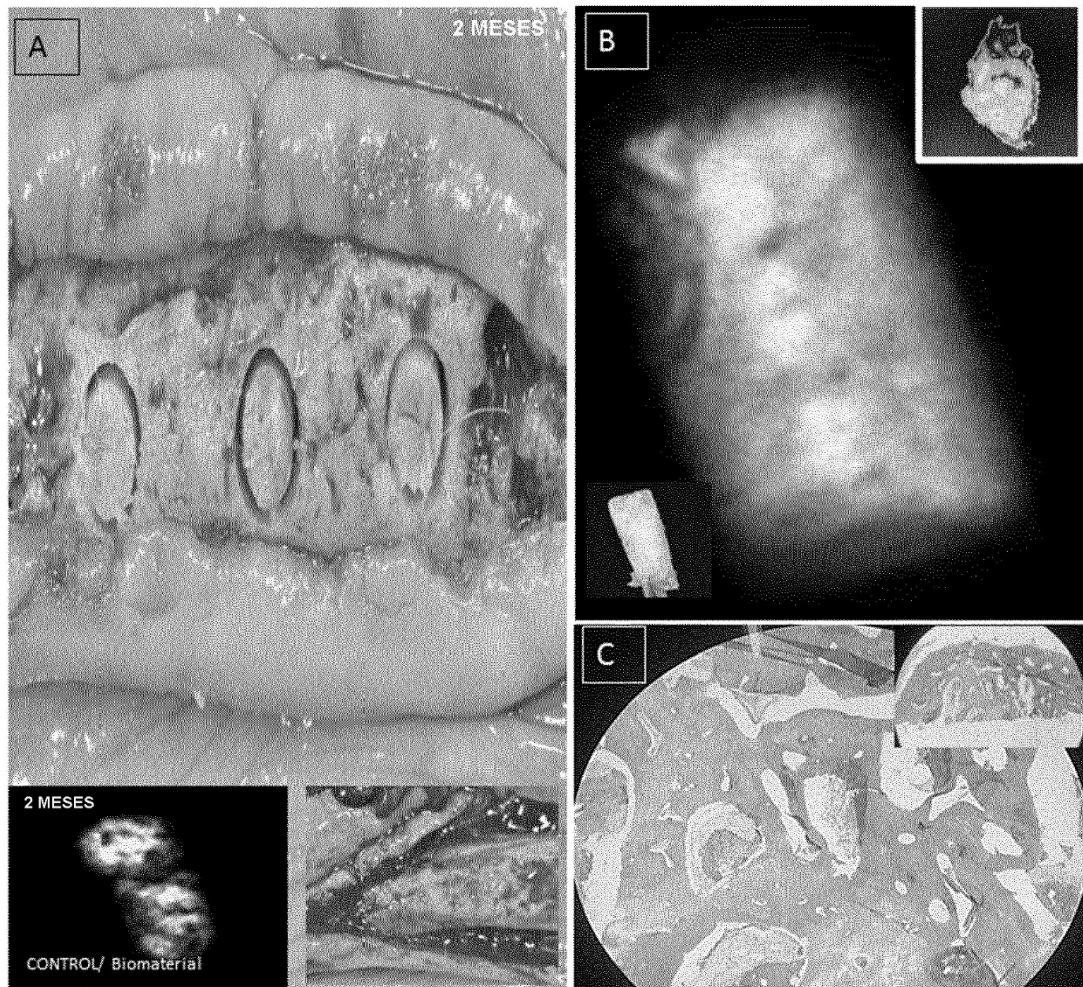


FIG. 12

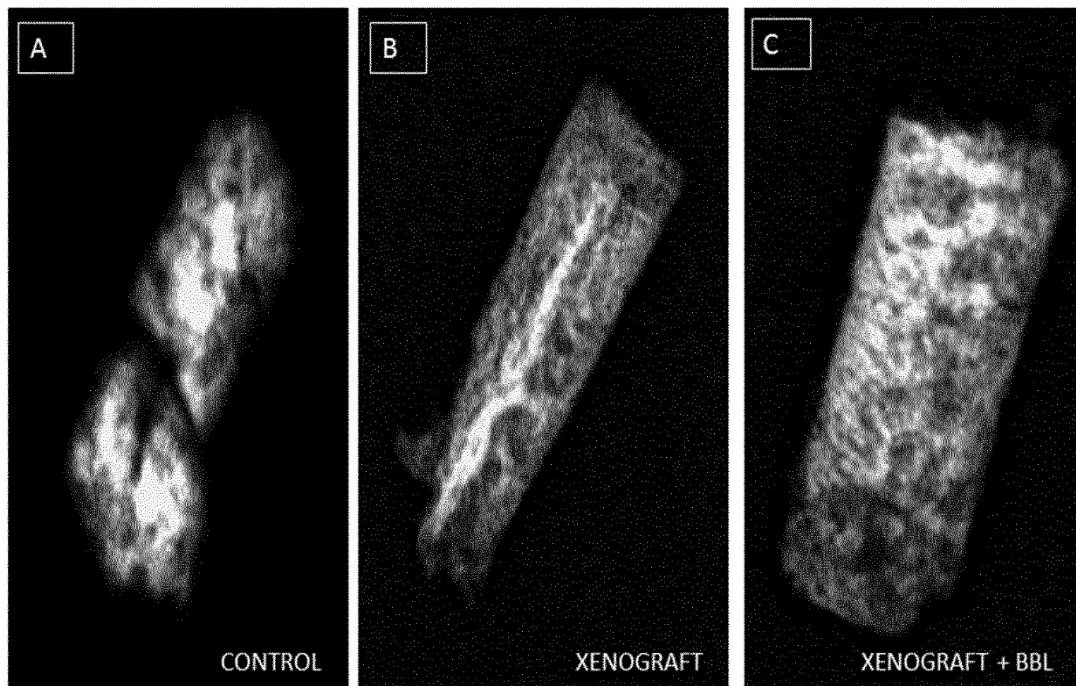


FIG. 13

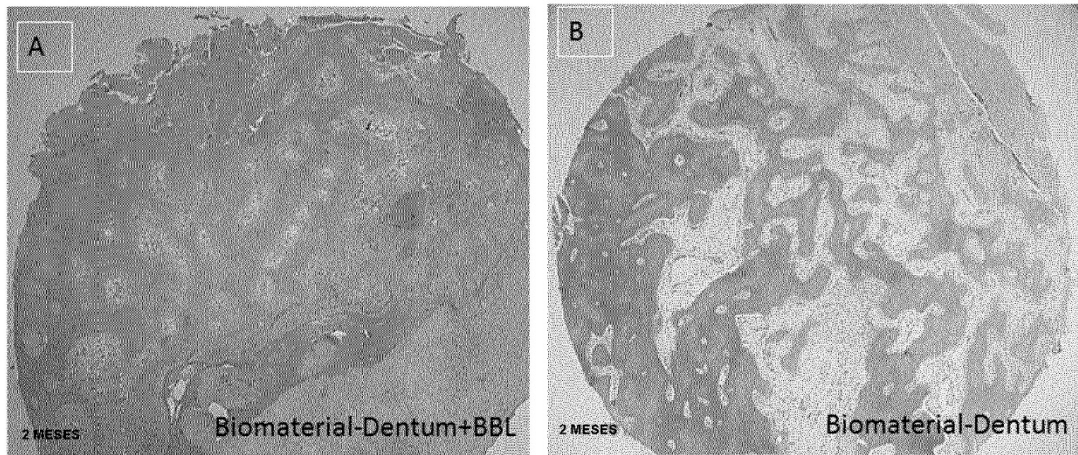


FIG. 14

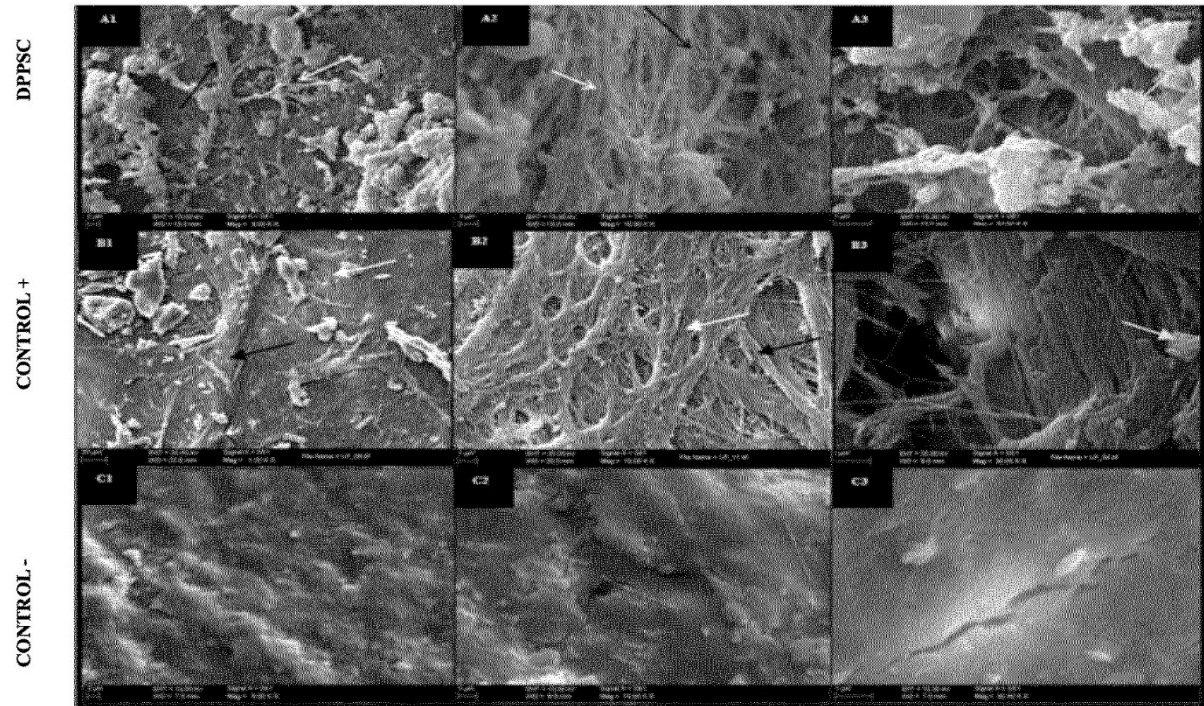
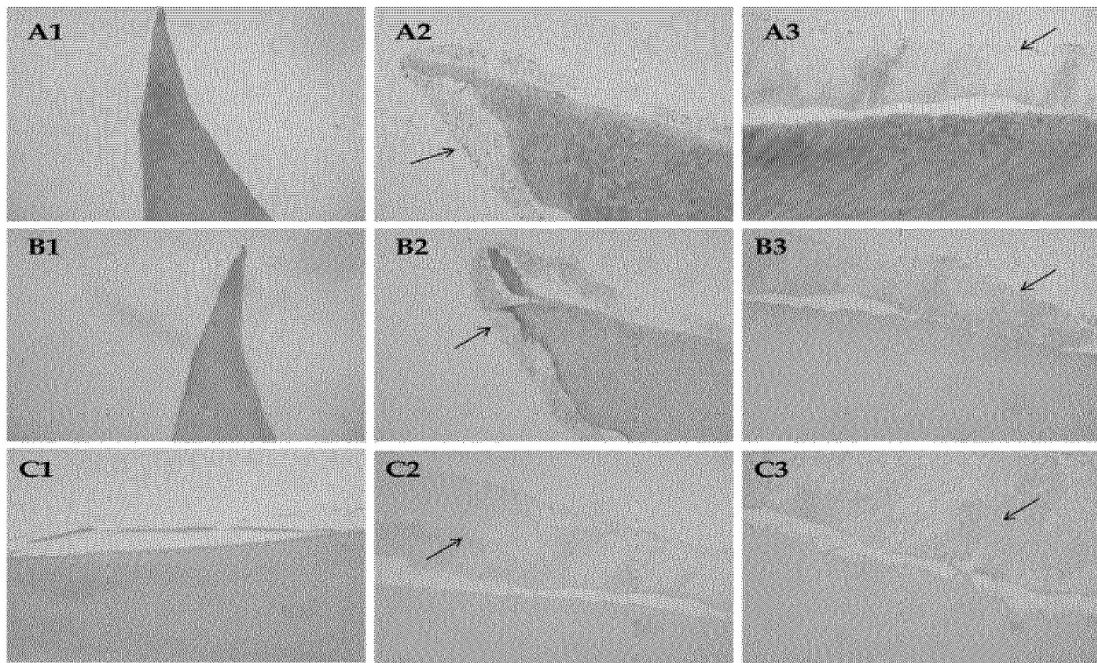


FIG. 15



Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 20070213832 A, Wen Hai B [0005] [0138]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **ALBREKTSSON T et al.** Osseointegrated titanium implants Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. Acta Orthop Scand, 1981, vol. 52, 155-170 [0002] [0139]
- **MOHAN S et al.** Bone growth factors. Clin Orthop Relat Res, 1991, vol. 263, 30-48 [0003] [0139]
- **URIST MR et al.** Bone cell differentiation and growth factors. Science, 1983, vol. 220, 680-686 [0003] [0139]
- **WOZNEY JM et al.** Growth factors influencing bone development. J Cell Sci, 1990, vol. 13, 149-156 [0003] [0139]
- **ANSELME K.** Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials, 2000, vol. 21, 667 [0003] [0004] [0139]
- **SCOTCHFORD CA et al.** Chemically patterned, metaloxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-in-teractions. II: Protein adsorption and early cell interctions. Biomaterials, 2003, vol. 24, 1147 [0004] [0139]
- **STEELE JG et al.** Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment. J Biomater Sci Polym Ed, 1993, vol. 5, 245 [0004] [0139]
- **HOWLETT CR et al.** Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture. Biomaterials, 1994, vol. 15, 213 [0004] [0139]
- **KILPADI KL et al.** Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel. J Biomed Mater Res, 2001, vol. 57, 258 [0004] [0139]
- **GARCIA AJ.** Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. Biomaterials, 2005, vol. 26, 7525 [0004] [0139]
- **LINDAHL C.** Biomimetic deposition of hydroxyapatite on titanium implant materials. Uppsala Univ, 01 January 2012, 978-91 [0006] [0139]
- Hydroxylapatite growth on single crystal rutile substrates. **LINDBERG F.** et al. Biomaterials. Elsevier Science Publishers BV, 01 August 2008, vol. 29, 3317-23 [0007] [0139]
- **SHEIKH Z et al.** Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. Biomater Res., 2017, vol. 21, 9 [0066] [0139]
- **YANG J et al.** Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. Dentomaxillofac Radiol, 03 July 2003, vol. 2 (4), 247-51 [0107]
- **GALLER KM et al.** Bioengineering of dental stem cells in a PEGylated fibrin gel. Regen Med., 2011, vol. 6 (2), 191-200 [0131] [0139]
- **YANG J et al.** Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. Dentomaxillofac Radiol, July 2003, vol. 32 (4), 247-51 [0139]