

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 123**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2019** **PCT/NL2019/050675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2020** **WO20076158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2019** **E 19828878 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023** **EP 3863691**

54 Título: **Partículas bioactivas de reparación ósea**

30 Prioridad:

11.10.2018 NL 2021794

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

18.06.2024

73 Titular/es:

ACCESS2BONE IP B.V. (100.0%)
Galileiweg 8
2333 BD Leiden, NL

72 Inventor/es:

VAN DE MORTEL, NOL;
SICKLER, MICHAEL y
DE ROODE-BEULING, NIENKE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 973 123 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

Partículas bioactivas de reparación ósea

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para preparar un sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos, al sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos y a la aplicación de dichos sustratos en el campo de la medicina regenerativa, en particular en la ingeniería ósea y del tejido conectivo.

Estado de la técnica

[0002] Cada año, se realizan más de dos millones de procedimientos de injerto óseo en todo el mundo para tratar fracturas óseas y otras lesiones relacionadas con la ortopedia que resultan de una variedad de causas quirúrgicas, degenerativas y traumáticas. La reparación de defectos óseos puede facilitarse colocando un material de reparación ósea en el lugar del defecto, donde se ha producido una pérdida de hueso natural o donde la reparación ósea está deteriorada. El material de reparación ósea está destinado a promover selectivamente y durante un período de tiempo prolongado la regeneración de las estructuras óseas naturales.

[0003] El tratamiento de referencia clínico actual es el hueso autólogo, extraído principalmente de la cresta ilíaca del paciente u otras ubicaciones como el fémur distal, la tibia proximal, las costillas y el canal intramedular. El hueso autólogo proporciona un andamio tridimensional osteoconductor para el crecimiento óseo, las células osteogénicas y los factores de crecimiento osteoinductivos. A pesar de su inmunocompatibilidad y sus excelentes propiedades osteoconductoras y osteoinductivas, el hueso para autoinjerto es de suministro limitado y a menudo se asocia a limitaciones como la necesidad de cirugía adicional, dolor en el sitio donante, morbilidad y una resorción alta e impredecible. Además, este procedimiento no es adecuado para personas mayores ni para personas con metabolismo óseo alterado, por ejemplo, en sujetos que padecen osteoporosis, diabetes mellitus y obesidad.

[0004] Estas limitaciones han llevado a una búsqueda continua de alternativas. Los materiales sintéticos de reparación ósea normalmente comprenden productos o materiales a base de fosfato cálcico. A diferencia de los materiales de reparación ósea naturales, los materiales sintéticos de reparación ósea suelen ser menos osteoconductivos y apenas osteoinductivos. Gran parte de la investigación se ha dirigido, y se sigue dirigiendo, hacia materiales sintéticos mejorados para la reparación ósea. El desarrollo de numerosos materiales alternativos para rellenar defectos óseos, como aloinjertos, xenoinjertos y materiales sintéticos, ha sido el resultado de una mejor comprensión de la biología de la curación de los huesos y del desarrollo tecnológico. La mayoría de estos materiales de injerto utilizados clínicamente son osteoconductores, lo que mejora la migración de células osteogénicas. La capacidad de los materiales del injerto para inducir osteogénesis se denomina osteoinductividad. Sin embargo, las reacciones a cuerpos extraños del material de injerto pueden dificultar significativamente la regeneración del hueso y la osteointegración del material utilizado para rellenar los defectos óseos. Por lo tanto, los efectos terapéuticos de los materiales de injerto alternativos para rellenar defectos óseos para la reparación ósea están lejos de ser satisfactorios.

[0005] La reparación y regeneración ósea es una cascada compleja de eventos biológicos, que involucra no solo componentes de matriz extracelular y células formadoras de hueso, sino también factores de crecimiento osteoinductivos y osteogénicos. Un desafío importante en este campo es encontrar un portador óptimo para la administración de proteínas en el lugar de la lesión. Aunque en ortopedia se han investigado intensamente diversos sistemas de administración de factores de crecimiento, todavía existe la necesidad de mejorar la administración de proteínas osteogénicas bioactivas capaces de promover la reparación o regeneración ósea a partir de un material de reparación ósea.

[0006] La aplicación de factores de crecimiento osteogénicos como la proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) adsorbiéndolos superficialmente en un andamio biomimético solo proporciona una liberación rápida a corto plazo de BMP2 que está asociada con efectos secundarios no deseados y los efectos osteoinductivos de estos agentes están limitados tanto en el tiempo como en el espacio. Se han desarrollado recubrimientos portadores que pueden liberar el factor de crecimiento BMP-2 secuencialmente para una liberación más sostenida, como los descritos en el documento WO2006/016807. Un recubrimiento de fosfato de calcio (CaP) con BMP2 incorporado mejora la osteoinductividad, pero sigue presentando el inconveniente de que el factor de crecimiento no se distribuye homogéneamente por todo el sustrato; se ha constatado una liberación constante durante un máximo de 5 semanas; el proceso de recubrimiento requiere mucho trabajo y es caro. El proceso implica la coprecipitación de dicho material bioactivo con los otros componentes de recubrimiento y requiere mucho trabajo, es difícil de ampliar y va acompañado de una pérdida significativa de material bioactivo valioso durante el proceso de recubrimiento debido a la adhesión a los recipientes de reacción. En el documento US2016/0184390 se desarrolla una matriz de injerto que

proporciona una liberación sostenida de BMP-2 donde se describen gránulos de calcio con microporos y macroporos en los que se absorbe la proteína osteoinductiva.

Sumario de la invención

[0007] Los presentes inventores han superado estas desventajas en la técnica anterior y han desarrollado un método para preparar un sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos con una distribución homogénea de materiales bioactivos en una matriz de fosfato cálcico. Según la presente invención, se incorpora un material bioactivo en un sustrato de fosfato cálcico a partir del cual se forman gránulos bioactivos de reparación ósea mediante fraguado y granulación. El presente método evita el uso de métodos tediosos para depositar un recubrimiento de capas de fosfato cálcico sobre un sustrato tal como se describen en Proc. Instr. Mech. Engrs vol 212 parte H por K. de Groot *et al.* También es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso para incorporar un material bioactivo en un sustrato de reparación ósea que se lleva a cabo por lotes. Se trata de un proceso simplificado y controlado que limita la pérdida de materiales valiosos.

[0008] Otro objeto de la invención es proporcionar un sustrato bioactivo para la reparación ósea que comprende gránulos con material bioactivo derivado de hueso, preferiblemente de matriz ósea desmineralizada, donde se utilizan ventajosamente cantidades bajas de material bioactivo. Se utilizan alrededor de 100 microgramos de material bioactivo derivado de hueso por gramo de producto final. Sin querer ceñirse a ninguna teoría, el sustrato bioactivo de reparación ósea con material bioactivo distribuido homogéneamente en el mismo permite la liberación constante y sostenida y la disponibilidad biológica de material bioactivo a lo largo del tiempo; permite así una función de señalización continua de diferentes factores osteoconductores y osteoinductivos obtenidos a partir de la matriz ósea desmineralizada. Se cree que esto favorece la reparación ósea *in situ* al imitar o mejorar la señalización del factor de crecimiento en la que intervienen varios factores diferentes en la reparación ósea fisiológica. Esto es claramente beneficioso en comparación con la inyección de material bioactivo extraído únicamente de matriz ósea desmineralizada en, sobre o cerca de sitios con defectos óseos en la técnica anterior; en la técnica anterior, la eficacia del material bioactivo se ve obstaculizada por la alta disponibilidad de todos los factores osteoinductivos y osteoconductores a la vez, careciendo así de una función de señalización continua. Se cree además que cuando la matriz ósea normalmente desmineralizada de un único donante proporciona material bioactivo para hasta aproximadamente cien pacientes o lados de tratamiento, el uso de material bioactivo extraído de la matriz ósea desmineralizada de un único donante en el sustrato de reparación ósea bioactiva de acuerdo con la invención proporciona un sustrato bioactivo de reparación ósea para entre 1000 y 10 000 pacientes o lados de tratamiento. Como el suministro de hueso donado es limitado, la invención aumenta ventajosamente el potencial de tratamiento del material bioactivo obtenido a partir de matriz ósea desmineralizada.

[0009] Cuando los gránulos se preparan a partir de una matriz de fosfato cálcico fraguada con una distribución homogénea de material bioactivo en su interior, se logra una liberación constante y mejor controlada de material bioactivo, durante periodos de tiempo prolongados, es decir, una liberación sostenida. El deseo en la técnica de prolongar la retención del factor de crecimiento o de la proteína osteogénica resalta la importancia de mantener la bioactividad de la proteína durante periodos de tiempo prolongados *in situ*.

[0010] Otro objeto de la invención es proporcionar un sustrato granulado de reparación ósea donde se incorpora un material bioactivo que sea particularmente útil en la ingeniería de tejido conectivo y tejido óseo o en la regeneración de fracturas óseas.

[0011] Estos y otros objetivos se exponen en la descripción detallada de la invención.

Lista de figuras

[0012] La figura 1 muestra los perfiles de carga y retención *in vitro* para la BSA incorporada en un gránulo de hidroxiapatita deficiente en calcio durante un período de 17 días. El porcentaje (%) de retención de BSA incorporada en los gránulos en el eje Y se representa frente al tiempo (en días) en el eje X, por lo que la línea discontinua que pasa por los puntos de medición sirve como guía para el ojo.

Descripción de formas de realización

[0013] La invención se refiere a un sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos que se pueden obtener o se obtienen a partir de una mezcla fraguada en estado sólido de una matriz basada en fosfato cálcico y un material bioactivo, y/o un sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos de una matriz basada en fosfato cálcico y al menos un material bioactivo disperso en dicha matriz, presentando dicho sustrato una liberación sostenida de al menos un material bioactivo, preferiblemente presentando una liberación de al menos un material bioactivo.

[0014] La invención también se refiere a un sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos de una matriz basada en fosfato cálcico y al menos un material bioactivo que se puede obtener o se obtiene de a)

mezclar un polvo de fosfato cálcico y un material bioactivo extraído de hueso, b) permitir que la mezcla alcance un estado sólido, c) formar gránulos a partir del estado sólido establecido, preferiblemente gránulos que tengan un diámetro promedio de 25 - 10 000 μm .

[0015] En el método según la invención, los gránulos bioactivos de reparación ósea se preparan de tal manera que, cuando se aplican *in vivo* permiten una liberación lenta, gradual, sostenida o prolongada del material bioactivo. En una forma de realización preferida la liberación sostenida de material bioactivo se logra durante el tiempo completo de recambio *in vivo* de la matriz osteoconductora o sustitución *in vivo* del fosfato cálcico por hueso. La liberación sostenida de material bioactivo puede caracterizarse por una liberación controlada y constante durante al menos ese período. En una forma de realización, la liberación de material bioactivo continúa preferiblemente durante al menos 4 semanas, más preferiblemente hasta 8 semanas, más preferiblemente hasta 3 meses y de la forma más preferible hasta 6 meses después del inicio del tratamiento.

[0016] En un aspecto, se proporciona un método para preparar un sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos de una matriz basada en fosfato cálcico y al menos un material bioactivo, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un polvo de fosfato cálcico, (b) proporcionar una solución acuosa que comprende un material bioactivo; (c) mezclar los componentes (a) y (b), para obtener una mezcla, y (d) permitir que la mezcla alcance un estado sólido, (e) formar gránulos a partir del estado sólido establecido, y (f) seleccionar los gránulos según el tamaño, preferiblemente gránulos que tengan un diámetro medio de 25 - 10 000 μm .

[0017] En un aspecto, se proporciona un método para preparar un sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos de una mezcla establecida en estado sólido de una matriz basada en fosfato cálcico y material bioactivo extraído de hueso, preferiblemente de una matriz ósea desmineralizada, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un polvo de fosfato cálcico, (b) proporcionar una solución acuosa que comprende material bioactivo derivado de hueso, preferiblemente material bioactivo derivado de matriz ósea desmineralizada humana; (c) mezclar los componentes (a) y (b), para obtener una mezcla, y (d) permitir que la mezcla alcance un estado sólido, (e) formar gránulos a partir del estado sólido establecido, y (f) seleccionar los gránulos según el tamaño, preferiblemente gránulos que tengan un diámetro medio de 25 - 10 000 μm .

A diferencia de los procesos en la técnica, el método de fabricación según la invención no necesita una reacción de precipitación de fosfato cálcico y material bioactivo a partir de dos soluciones de sal de calcio sobre un gránulo de sustrato.

[0018] En un aspecto de la invención, la relación en peso de la matriz de fosfato de calcio al material bioactivo en el paso (c) está entre 10:0,0001 y 10:1, más preferiblemente entre 10:0,0005 y 10:0,2, más preferiblemente entre 10:0,005 y 10:0,1, más preferiblemente entre 10:0,005 y 10:0,001, o incluso más preferiblemente entre 10:0,01 y 10:0,0005.

[0019] En el paso (c), los componentes (a) y (b) se mezclan preferiblemente para formar una distribución homogénea o uniforme de material bioactivo dispersado en una matriz de fosfato cálcico. Esto significa preferiblemente que la variación en la concentración del material bioactivo es inferior al 40 %, preferiblemente inferior al 30 %, más preferiblemente inferior al 20 %, incluso más preferiblemente inferior al 10 %, de la manera más preferible inferior al 5 % durante todo el estado sólido establecido después del paso (d).

[0020] El término solución acuosa tal como se aplica en el paso (b) significa un líquido a base de agua que comprende al menos 80 % en peso de agua, preferiblemente al menos 85 % en peso, más preferiblemente al menos 90 % en peso, más preferiblemente al menos 95 % en peso, basado en el peso total del líquido.

[0021] En un aspecto de la invención, la cantidad de material bioactivo en el líquido acuoso (b) es preferiblemente menos del 1 % en peso, más preferiblemente menos del 0,5 % en peso, incluso más preferiblemente menos del 0,1 % en peso, incluso más preferiblemente menos del 0,05 % en peso, basado en el peso total del líquido. En una forma de realización preferida, la cantidad de material bioactivo es al menos 0,005 % en peso, preferiblemente al menos 0,01 % en peso, preferiblemente al menos 0,02 % en peso basado en el peso total del líquido.

[0022] En un aspecto de la invención, el método para preparar el sustrato bioactivo de reparación ósea se realiza por lotes. En un aspecto del método, se mezcla un polvo de fosfato cálcico con un líquido acuoso que comprende material bioactivo en una proporción de polvo a líquido de entre 4:1 y 1,5:1, más preferiblemente entre 3:1 y 1,5:1, más preferiblemente 2,5:1 y 1,5:1. En un aspecto, se mezclan 200 gramos de un polvo de fosfato cálcico con 100 gramos de líquido acuoso que comprende material bioactivo.

[0023] El método de preparación del sustrato bioactivo de reparación ósea según la invención se lleva a cabo preferiblemente dentro de un rango de temperatura de 15 - 85 °C, preferiblemente 20 - 80 °C, preferiblemente 30 - 80 °C, más preferiblemente 30 - 60 °C y de la manera más preferible 30 - 35 °C. Preferiblemente, el método también se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. La temperatura se puede utilizar para influir en la velocidad de fraguado. En un aspecto de la invención, el método de la invención no implica el pH para un

parámetro (es decir, es independiente del pH) y el método no implica la precipitación del material bioactivo y/o el polvo de fosfato cálcico.

[0024] El "fraguado" se refiere a la reacción del agua con el fosfato cálcico. La acción de pasar de una suspensión a un estado sólido se llama "fraguado". El fraguado del fosfato cálcico es un proceso tradicional. Los tiempos de fraguado típicos están en el rango de 20 minutos a 3 días.

[0025] "Estado sólido", tal como se usa en la solicitud, se refiere a fosfato de calcio que experimentó una reacción de hidratación en presencia de un líquido y, por lo tanto, se solidificó o se estableció en estado sólido.

[0026] En un aspecto adicional, el método según la invención proporciona la generación de sustrato bioactivo de reparación ósea que es estable en almacenamiento, es decir, que se puede almacenar a temperatura ambiente durante al menos 6 meses, preferiblemente al menos 1 año y más preferiblemente al menos hasta a 2 años. La estabilidad en almacenamiento es una consecuencia del método de fabricación, en el que el material bioactivo está presente en todos los gránulos y permanece seco después del fraguado.

Gránulos

[0027] Como se usa en el presente documento, los materiales osteoconductores se refieren a cualquier material que forme una matriz que facilite el crecimiento interno de células osteoblásticas, incluidos osteoblastos, preosteoblastos, células osteoprogenitoras, células madre mesenquimales y otras células que son capaces de diferenciarse o promover de otro modo el desarrollo de células que sintetizan y/o mantienen el tejido óseo. En formas de realización preferidas de la presente invención, el material osteoconductor es un gránulo que comprende una matriz de fosfato de calcio para proporcionar una liberación sostenida de un material biológico activo, preferiblemente una sustancia osteoinductiva que se carga y se distribuye a través de una matriz de fosfato de calcio.

[0028] Como se usa en el presente documento, un "material osteoinductivo" se refiere a un material que sea capaz de inducir la formación de hueso (es decir, un material con propiedades osteogénicas) cuando se implante en un cuerpo e incluya matriz ósea desmineralizada y factores osteoinductivos. El término factor osteoinductivo se refiere, por ejemplo, a los materiales descritos como factores de crecimiento óseo. La matriz ósea desmineralizada y las proteínas morfogénicas óseas (BMP) se consideran sustancias osteoinductivas o materiales osteoinductivos que pueden mejorar el crecimiento óseo.

[0029] Los gránulos usados en el sustrato de reparación ósea de la invención generalmente están hechos de fosfato(s) de calcio que tienen una composición y arquitectura apropiadas para permanecer en su lugar y liberar material bioactivo durante intervalos de tiempo óptimos para la formación y curación del hueso. Si bien estas características pueden variar entre aplicaciones, las composiciones ejemplares de los gránulos de sustrato de reparación ósea generalmente incluyen gránulos que comprenden una matriz de fosfatos de calcio tales como monohidrato de fosfato monocalcico, fosfato dicálcico, fosfato dicálcico deshidratado, fosfato octocalcico, hidroxiapatita precipitada, fosfato cálcico amorfo precipitado, fosfato monocalcico, alfa-fosfato tricálcico (α -TCP), beta-fosfato tricálcico (β -TCP), hidroxiapatita sinterizada, oxiapatita, fosfato tetracálcico, hidroxiapatita, hidroxiapatita deficiente en calcio y combinaciones de los mismos. En un aspecto, la selección de fosfatos de calcio determina en parte el perfil de liberación del material bioactivo a partir del sustrato bioactivo de reparación ósea.

[0030] Los gránulos usados en los sustratos de reparación ósea según la invención generalmente comprenden microporos interconectados que tienen una porosidad de aproximadamente 1 a 50 %, más preferiblemente entre 5 y 45 % y más preferiblemente entre 10 y 30 %. La porosidad es el porcentaje del espacio vacío formado por los microporos interconectados dentro de los gránulos por unidad de volumen de gránulos. Los microporos son poros dentro de los gránulos usados en el sustrato de reparación ósea que generalmente están interconectados dentro de los gránulos y tienen un diámetro de menos de aproximadamente 10 micrómetros. En una forma de realización preferida, el diámetro de los microporos es de entre 0,05 y 10 μ m. La microporosidad proporcionada por los microporos interconectados en los gránulos proporciona la ventaja de que los gránulos tienen un área superficial mayor y se integran fácilmente en el hueso en curación. La microporosidad se puede medir mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), utilizando ISO13175-3.

[0031] Los gránulos utilizados en el sustrato de reparación ósea según la invención preferiblemente no tienen macroporos dentro de los gránulos. Los macroporos dentro de los gránulos se definen como poros dentro de un gránulo con un diámetro de aproximadamente 40 a 100 micrómetros. Los gránulos utilizados en el sustrato de reparación ósea según la invención presentan microporos interconectados pero sustancialmente ningún macroporo dentro de los gránulos. Los gránulos usados en el sustrato de reparación ósea están sustancialmente libres de macroporos dentro de los gránulos; menos del 2 % de los gránulos tiene macroporos, más preferiblemente menos del 1 % de los gránulos tiene macroporos y de la manera más preferible menos del 0,5 % de los gránulos tiene macroporos dentro de los gránulos.

[0032] En un aspecto, el sustrato de reparación ósea tiene una macroporosidad formada por los poros entre los gránulos del sustrato de reparación ósea de aproximadamente el 50 %, más preferiblemente de aproximadamente el 60 %, más preferiblemente de aproximadamente el 70 % e incluso más preferiblemente de aproximadamente el 80 %. La macroporosidad del sustrato de reparación ósea no resulta de macroporos dentro de los gránulos del sustrato de reparación ósea. El sustrato de reparación ósea tiene preferiblemente una macroporosidad entre 50 % y 90 %, más preferiblemente entre 60 % y 80 % y de la manera más preferible entre 70 % y 80 %. Los propios gránulos utilizados en el sustrato de reparación ósea según la invención no presentan macroporos. La macroporosidad formada por los poros entre los gránulos del sustrato de reparación ósea se evalúa mediante SEM.

[0033] El sustrato bioactivo de reparación ósea se encuentra en forma de gránulos. Los diámetros se aplican a la dimensión más grande del gránulo a menos que se indique lo contrario. Los gránulos preferiblemente tienen un diámetro promedio entre 25 - 10 000 μm , preferiblemente entre 50 - 5 000 μm , más preferiblemente 100 - 2 500 μm , más preferiblemente 125 - 2 000 μm e incluso más preferiblemente 250 - 2 000 μm . El diámetro se puede determinar mediante SEM o análisis granulométrico según ISO13175-3.

[0034] Los gránulos del sustrato de reparación ósea se forman según el proceso descrito, obteniéndose el tamaño de los gránulos usando procesos generalmente conocidos tales como trituración, molienda y similares, seguido de la selección del tamaño usando técnicas conocidas en la técnica tales como tamizado. Cuando las partículas deseadas se obtienen mediante tamizado, esto puede realizarse preferiblemente mediante tamizado "en seco". Se hace referencia a la norma ISO número ISO13175-3 que establece dichos métodos conocidos en la técnica.

Material bioactivo

[0035] El sustrato bioactivo de reparación ósea comprende gránulos formados mediante el método según la invención donde el material bioactivo se distribuye homogéneamente por todo el estado sólido establecido, seguido de la formación de gránulos del estado sólido y la selección de la distribución de tamaño de gránulo apropiada.

[0036] La distribución del material bioactivo en los gránulos se basa en la concentración homogénea del material bioactivo en el estado sólido establecido y el tamaño de los gránulos. En un aspecto, el sustrato bioactivo de reparación ósea comprende gránulos obtenidos del estado sólido en el que al menos el 10 % en volumen de los gránulos comprende material bioactivo, preferiblemente al menos el 15 % en volumen, más preferiblemente al menos el 20 % en volumen, más preferiblemente al menos el 30 % en volumen, más preferiblemente al menos 35 % en volumen, más preferiblemente al menos 40 % en volumen, incluso más preferiblemente al menos 50 % en volumen, de la manera más preferible al menos 60 % en volumen, incluso más preferiblemente al menos 70 % en volumen, particularmente al menos 80 % en volumen, más particularmente al menos el 90% en volumen e incluso más particularmente el 100% en volumen de los gránulos en el sustrato comprenden dicho material bioactivo.

[0037] En un aspecto de la invención, el material bioactivo utilizado en el sustrato bioactivo de reparación ósea forma al menos un 0,001 % en peso con respecto al peso total del sustrato bioactivo de reparación ósea, más preferiblemente al menos un 0,005 % en peso, más preferiblemente al menos un 0,01 % en peso e incluso más preferiblemente 0,02 % en peso con respecto al peso total del sustrato bioactivo de reparación ósea. En un aspecto adicional de la invención, el material bioactivo forma como máximo un 0,2 % en peso del peso total del sustrato bioactivo de reparación ósea, más preferiblemente como máximo un 0,15 % en peso, más preferiblemente como máximo un 0,1 % en peso y de la manera más preferible como máximo un 0,02 % en peso en relación con el peso total del sustrato bioactivo de reparación ósea.

[0038] Normalmente, el material bioactivo utilizado en el sustrato bioactivo de reparación ósea forma entre 0,001 y 0,2 % en peso, preferiblemente entre 0,002 y 0,1 % en peso, más preferiblemente entre 0,005 y 0,05 % en peso, más preferiblemente entre 0,010 y 0,03 % en peso del peso total de los gránulos bioactivos de reparación ósea.

[0039] En un aspecto, aproximadamente el 100 % de los gránulos de fosfato cálcico comprenden material bioactivo. En una forma de realización más preferida, el material bioactivo se distribuye uniforme u homogéneamente en todos los gránulos individuales. Esta distribución homogénea significa que la variación en la concentración del material bioactivo es preferiblemente menos del 40 %, preferiblemente menos del 30 %, más preferiblemente menos del 20 %, incluso más preferiblemente menos del 10 % y de la manera más preferible menos del 5 %. Además, se prefiere que se aplique la misma variación máxima en las concentraciones promedio de material bioactivo entre los gránulos.

[0040] La distribución de material bioactivo a través del sustrato de reparación ósea y las propiedades de liberación sostenida asociadas se pueden caracterizar por una prueba de liberación. Una prueba de liberación adecuada para evaluar las propiedades de liberación sostenida del material bioactivo según la invención es una

prueba ELISA o un ensayo cuantitativo de proteínas. "Liberación sostenida" como se usa en el presente documento significa que la liberación de material bioactivo dura y puede medirse y cuantificarse usando una prueba de liberación preferiblemente durante al menos 2 semanas, preferiblemente al menos 4 semanas, más preferiblemente al menos 6 semanas, más preferiblemente al menos 8 semanas, más preferiblemente al menos 10 semanas e incluso más preferiblemente al menos 12 semanas.

[0041] Una prueba ELISA sobre un sustrato sumergido en condiciones *in vitro*, preferiblemente en un medio salino, es una prueba de liberación adecuada para evaluar las propiedades de liberación del material bioactivo. Con el kit de herramientas ELISA adecuado (por ejemplo, BMP-2 ELISA (catálogo de R&D Systems #DBP200)), se evalúa la liberación del material bioactivo de gránulos formados a partir del estado sólido e incubados en solución salina, lo que permite una medición cuantitativa de la liberación de los niveles de material bioactivo de los gránulos bioactivos de reparación ósea a solución salina con el tiempo. En un aspecto la liberación sostenida de material bioactivo se determina *in vitro* incubando una cantidad establecida de sustrato de reparación ósea en un volumen establecido de solución salina. A la cantidad de material bioactivo liberado en solución salina le sigue la cuantificación de la cantidad de material bioactivo en alícuotas sobrenadantes tomadas en diferentes momentos como, por ejemplo, diariamente durante 2 semanas, preferiblemente durante 4 semanas y más preferiblemente durante 6 semanas. Se pueden tomar alícuotas del sobrenadante y la concentración de material bioactivo en la solución salina se puede medir mediante ELISA en puntos de tiempo longitudinales hasta que no se pueda detectar ningún aumento en la concentración de material bioactivo del sobrenadante. El experto conoce los ensayos ELISA convencionales y las formas de trabajar dentro de los rangos de detección de dichos ensayos ELISA. Por ejemplo, los kits ELISA para la cuantificación de niveles de proteína de BMP-2 humana, de rata o de ratón o de BMP-7 humana están disponibles comercialmente, por ejemplo, en R&D Systems (catálogo #DBP200, PDBP200, SBP200 o catálogo #DY354, respectivamente). En una forma de realización, 'liberación sostenida' significa que la liberación de material bioactivo dura preferiblemente al menos 2 semanas, preferiblemente al menos 4 semanas, más preferiblemente al menos 6 semanas, más preferiblemente al menos 8 semanas, más preferiblemente al menos 10 semanas, incluso más preferiblemente al menos 12 semanas después del inicio de la prueba *in vitro*, y las condiciones de la prueba se adaptan a esos intervalos de tiempo. La cinética de liberación de una selección de al menos un factor bioactivo tal como BMP-2 es representativa de la liberación de otros factores bioactivos del sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos de fosfato cálcico y material bioactivo. La detección del factor bioactivo evaluado por encima del límite de detección de la prueba generalmente se considera liberación.

[0042] Las propiedades de liberación sostenida del material bioactivo se pueden caracterizar además mediante un ensayo cuantitativo de proteínas tal como un ensayo de proteínas de Bradford (BioRad #500-0201). Por lo tanto, el sustrato se sumerge en condiciones *in vitro*, preferiblemente en medio salino. Se toman muestras de alícuotas del medio en diferentes momentos durante la inmersión y se cuantifican los niveles de proteína en el sobrenadante. Se toman alícuotas en diferentes momentos, como, entre otros, diariamente durante 2 semanas, preferiblemente durante 4 semanas o más preferiblemente durante 6 semanas. Los niveles de proteína a lo largo del tiempo son indicativos de la liberación de material bioactivo del sustrato bioactivo de reparación ósea.

[0043] En un aspecto, la retención *in vitro* medida del material bioactivo en el sustrato bioactivo de reparación ósea es preferiblemente al menos 50 %, preferiblemente al menos 60 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 85 % después de 17 días de la cantidad inicial de material bioactivo en el sustrato bioactivo de reparación ósea.

[0044] En un aspecto de la invención, los gránulos bioactivos de reparación ósea comprenden un recubrimiento adicional con material bioactivo donde la concentración de material bioactivo es de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 %, preferiblemente de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % mayor que en el gránulo bioactivo de reparación ósea. Se puede proporcionar un recubrimiento de material bioactivo adicional para permitir una liberación inicial de material bioactivo.

[0045] En una forma de realización, los materiales bioactivos para su uso en el sustrato de reparación ósea generalmente incluyen factores de crecimiento humanos. En una forma de realización, los materiales bioactivos para su uso en el sustrato de reparación ósea se derivan de hueso alogénico o xenogénico, en particular de matriz ósea desmineralizada. Los materiales bioactivos para su uso en el sustrato de reparación ósea y derivados de hueso alogénico o xenogénico se pueden obtener a través de métodos como los descritos en el presente documento y en la técnica de acuerdo con el documento US 5,236,456. En una forma de realización, el material bioactivo para uso en el sustrato de reparación ósea también puede comprender una mezcla de materiales bioactivos derivados de hueso y materiales bioactivos recombinantes.

[0046] En una forma de realización, los materiales bioactivos para su uso en el sustrato de reparación ósea generalmente incluyen uno o más factores de crecimiento que estimulan la generación de osteoblastos a partir de poblaciones de células precursoras. En algunas formas de realización, el material osteoinductivo es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), como BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-9 o un miembro de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) como PIGF, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PGF o VEGF, y/o mezclas de los mismos.

[0047] La matriz ósea desmineralizada, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material que se pueda obtener extrayendo material mineral del tejido óseo de acuerdo con técnicas de banco de tejido convencionales como se describe en Reddi *et al.* "Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats", Proc. Nat. Acad. Sci, 69 págs. 1601 - 5 (1972), Zhang *et al.* "Effect(s) of the Demineralization Process on the Osteoinductivity of Demineralized Bone Matrix" Journal of Periodontology, volumen 68, número 11 (1997) y según el documento US 6,189,537 y según el documento US 7,811,608. En una forma de realización preferida, la matriz ósea desmineralizada descrita en el presente documento incluye preparaciones que contienen menos del 8 % de calcio y preferiblemente no menos de aproximadamente el 2 % de calcio en peso.

[0048] En un aspecto, los materiales bioactivos extraídos de hueso y los gránulos de una matriz basada en fosfato cálcico para su uso en el sustrato bioactivo de reparación ósea se pueden obtener según el método que comprende los pasos (a) proporcionar un polvo de fosfato cálcico, (b) proporcionar un líquido acuoso que comprenda un material bioactivo procedente de matriz ósea desmineralizada, preferiblemente material bioactivo humano; (c) mezclar los componentes (a) y (b), para obtener una mezcla, y (d) permitir que la mezcla alcance un estado sólido, formando gránulos a partir del estado sólido establecido, y (f) seleccionar los gránulos en base al tamaño, preferiblemente gránulos que tengan un diámetro promedio de 25 - 10000 μm .

[0049] El material bioactivo de hueso se puede obtener de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Los productos de matriz ósea desmineralizada pueden servir como fuente para la extracción de material bioactivo, que también están disponibles comercialmente, incluso, por ejemplo, en AlloSource (Denver, CO, EE. UU.), KeraLink (Baltimore, Maryland) y otros. La fuente ósea puede seleccionarse entre hueso cortical, esponjoso o corticoesponjoso. Además, el hueso puede ser de origen alogénico o xenogénico; en una forma de realización preferida el hueso es hueso humano. El uso de material bioactivo de hueso en composiciones de reparación de tejidos se describe en la técnica, como los documentos US 4,394,370, US 5,405,390 y 5,236,456.

[0050] El material bioactivo extraído de hueso se puede obtener mediante un método con los siguientes pasos: 1) desmineralizar el tejido óseo para proporcionar una matriz ósea desmineralizada de la que se ha retirado al menos parte del contenido de calcio original del tejido, 2) someter la matriz ósea desmineralizada a un paso promovido por ácido que da como resultado la escisión de enlaces intramoleculares en moléculas de colágeno para proporcionar un producto de escisión que es soluble en ácido al calentarse, y exponer dicho producto simultáneamente con o después del paso promovido por ácido a temperaturas entre aproximadamente 15 °C y 85 °C, más preferiblemente entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 60 °C y de la manera más preferible entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C para proporcionar una composición osteogénica líquida, 3) opcionalmente liofilizar y convertir el material en un polvo mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, y 4) opcionalmente resolubilizar o reconstituir el polvo así obtenido en un líquido acuoso de modo que la composición que comprende el material bioactivo esté en una forma adecuada para mezclar. Opcionalmente, la forma sólida del material bioactivo también se puede obtener colocando la solución líquida viscosa en una bolsa de diálisis de celulosa, eliminando las sales resultantes mediante diálisis o procesos similares conocidos en la técnica.

[0051] En un aspecto preferido del método de desmineralización ósea, el hueso se desmineraliza en el paso 1) a temperatura ambiente, preferiblemente durante aproximadamente 1 a 72 horas, preferiblemente aproximadamente 1 a 24 horas, y más preferiblemente durante aproximadamente 1 a 12 horas. Los ácidos que se pueden usar en el método de desmineralización para obtener material bioactivo a partir de hueso desmineralizado incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, así como ácidos orgánicos tales como ácido ascórbico, ácido fórmico, ácido acético, ácido peracético, ácido cítrico y ácido propiónico. El hueso se desmineraliza preferiblemente con ácido clorhídrico. La concentración del ácido usado en el método de desmineralización es preferiblemente de aproximadamente 0,5 N a aproximadamente 1,0 N.

[0052] La concentración del ácido usado en el tratamiento promovido por ácido del paso 2) es preferiblemente de aproximadamente 2,0 N a aproximadamente 3,0 N. El tratamiento promovido por ácido del paso 2) se realiza preferiblemente con un ácido orgánico. Alternativamente, el paso 2 se puede realizar durante el tiempo de desmineralización del paso 1) dentro del intervalo de tiempo preferido de 1 a 72 horas del paso 3).

[0053] El material bioactivo derivado de hueso alogénico o xenogénico, en particular el material bioactivo derivado de matriz ósea desmineralizada, comprende una selección o todos los factores siguientes: proteínas no colágenas que incluyen fosfoproteínas, osteocalcina, proteína Gla de matriz; factores de crecimiento osteoinductivos incluyendo proteínas morfogénicas óseas (BMP) tales como BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7; factores que contribuyen al crecimiento óseo, como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), el factor de crecimiento similar a la insulina I e II (IGF-I e IGF-II), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF-beta 1), así como colágeno de tipo I y trazas de calcio.

[0054] En otra forma de realización más, el material bioactivo para uso en el método para preparar los gránulos bioactivos de reparación ósea incluye uno o más compuestos citostáticos que inhiben el crecimiento de células

cancerosas óseas. En algunas formas de realización, el citostático se selecciona entre doxorrubicina, cisplatino, carboplatino, etopósido, fosfamida, metotrexato o vincristina o combinaciones de los mismos.

[0055] En un aspecto, el material bioactivo de la invención puede comprender uno o más de cualquiera de los factores de crecimiento anteriores. En una forma de realización preferida, el material bioactivo comprende al menos un factor de crecimiento tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, en una forma de realización más preferida el material bioactivo comprende factores osteoinductivos y osteoconductores derivados de hueso alógeno o xenogénico, en particular de matriz ósea desmineralizada.

[0056] En un aspecto de la invención, el material bioactivo se deriva de hueso de donante xenogénico donde el hueso xenogénico es de origen mamífero, preferiblemente de origen bovino, porcino o reno.

[0057] En un aspecto de la invención, el material bioactivo se distribuye de manera uniforme u homogénea en la matriz de fosfato cálcico durante la mezcla del fosfato cálcico y el material bioactivo. El material bioactivo permanece biológicamente activo durante un período de tiempo sostenido. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la incorporación del material bioactivo a lo largo y dentro del sustrato a base de fosfato cálcico proporciona un ambiente seco en el que la bioactividad permanece estable, permitiendo así la estabilidad durante períodos de tiempo prolongados.

[0058] En un aspecto, la liberación de material bioactivo de los gránulos de reparación ósea obtenidos según el método de la invención puede requerir la misma resorción osteoclástica observada para la liberación de proteína morfogénica ósea (BMP) del hueso. En un aspecto preferido, los gránulos bioactivos de reparación ósea según la invención se reabsorben *in vivo*, lo que permite la liberación del material bioactivo durante un período de tiempo prolongado.

[0059] Los gránulos bioactivos de reparación ósea se pueden usar para tratar o prevenir la pérdida ósea, promover la unión o el tejido de una fractura, y/o aumentar de otro modo la masa ósea o tratar una afección ósea en el paciente. Un mamífero adecuado para los métodos terapéuticos según la invención incluye un primate, humano, roedor, canino, felino, bovino, ovino, equino, suido, caprino, porcino, reno y similares. La capacidad de un agente o composición de la invención para tratar fracturas y defectos óseos se puede determinar utilizando ensayos bien conocidos en la técnica.

[0060] En un aspecto de la invención, el sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende los gránulos que se pueden obtener mediante el método según la invención es de uso terapéutico en el tratamiento de defectos óseos en sujetos que lo necesitan. En un aspecto, el sustrato bioactivo de reparación ósea se utiliza como dispositivo médico.

[0061] Los productos según la invención generalmente tienen características diseñadas para facilitar el crecimiento y la curación del hueso durante un período de tiempo sostenido. La cinética de liberación del material bioactivo es tal que mejora la curación, el crecimiento y/o la regeneración ósea. Además, la estructura de los gránulos según la invención facilita la formación de hueso nuevo sin perjudicar el proceso de curación; en una forma de realización preferida, el sustrato de reparación ósea es biodegradable. Los gránulos bioactivos de reparación ósea son de particular uso en mamíferos que padecen lesiones óseas complejas o grandes, o que padecen procesos de recambio óseo deteriorados tales como aquellos que padecen osteoporosis, diabetes mellitus y/u obesidad. Se cree que la liberación sostenida de material bioactivo permite inducir y apoyar la formación de hueso. Sin estar ligado a ninguna teoría, también se cree que la liberación sostenida de material bioactivo del sustrato de reparación ósea bioactivo apoya la respuesta fisiológica de reparación ósea sin inducir un crecimiento óseo adicional no fisiológico debido a la liberación de cantidades excesivas de material bioactivo.

[0062] La presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a varios ejemplos de formas de realización. Son posibles las modificaciones e implementaciones alternativas de algunas piezas o elementos, y están incluidas en el alcance de protección tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

[0063] Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1 - síntesis de gránulos bioactivos de hidroxiapatita deficientes en calcio

[0064] Un método ejemplar para preparar los gránulos según la invención comprende mezclar los componentes A y B:

Componente A: un polvo

[0065] El polvo consiste en una mezcla equimolar de fosfato tetracálcico (TTCP) y fosfato dicálcico (DCPD).

[0066] TTCP se sintetiza a partir de una reacción en estado sólido entre CaHPO_4 y CaCO_3 (J.T. Baker Chemical, Phillipsburg, NJ) a 1500 °C durante 6 h. Luego, el TTCP se muele y se tamiza para obtener partículas con tamaños que oscilan entre 1 y 60 μm , con un tamaño medio de 20 μm .

[0067] Los intentos que utilizaron DCPD comercial dieron como resultado largos tiempos de fraguado; por lo tanto, se sintetiza el DCPD. Brevemente, el DCPD se precipita aumentando el pH de una solución de monohidrato de fosfato monocalcico de DCPD de 1,90 a 3,5 mediante la adición de CaCO_3 . El pH final está por debajo del punto singular de DCPD-hidroxiapatita de 4,2 para evitar la precipitación de hidroxiapatita. El DCPD recogido se lava y se seca al aire. Posteriormente, el DCPD se muele para obtener un rango de tamaño de partícula de 0,5 a 4 μm , con un tamaño medio de 1,3 μm . Luego, el polvo de DCPD se mezcla con TTCP en una relación molar de 1:1 para formar el polvo del componente A para la matriz de fosfato de calcio.

Componente B: un líquido

[0068] El líquido comprendía fosfato de sodio como acelerador del endurecimiento e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) como agente gelificante, siguiendo el estado de la técnica.

[0069] Una solución de fosfato de sodio (una mezcla de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 con una concentración iónica total de PO_4 de 3 mol/L; Abbott, North Chicago, IL) se diluye con agua destilada para obtener una concentración de fosfato de sodio de 0,2 mol/L. Luego se añade HPMC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; viscosidad = 100 000 centipoises al 2 % en masa en agua) a la solución en una fracción en masa de HPMC del 1 % siguiendo un estudio previo. El material bioactivo se añade a la solución.

[0070] Posteriormente, los componentes A y B se mezclan en una proporción de polvo (A) a líquido (B) de 1:4, seguido del asentamiento del material en condiciones controladas (25 °C, 75 % de humedad) durante 3 días para establecerse en un estado sólido de fosfato de calcio.

[0071] Una vez que se alcanza el estado sólido el material se tritura mediante una trituradora de mandíbula. Posteriormente, los gránulos así obtenidos se tamizan para obtener gránulos en un intervalo de tamaño deseado entre 250 y 2000 μm .

Ejemplo 2 - Material osteogénico (bioactivo) procedente de hueso humano

[0072] El hueso humano se desgrasa y desinfecta mediante incubación durante 1 hora en una solución de etanol al 70 %.

[0073] Posteriormente el hueso se pulveriza y se tamiza hasta obtener un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 500 μm . Después de desgrasar y triturar, el hueso se sumerge en ácido clorhídrico 0,5 N durante 12 horas para efectuar la desmineralización de las partículas de hueso. Una vez completada la operación de desmineralización, el tejido óseo se somete a un tratamiento separado promovido por ácido acompañado de calentamiento que implica una incubación con ácido clorhídrico 2 N durante 2 horas a una temperatura de aproximadamente 40 °C. Las partículas de hueso experimentan un cambio de fase inducido por este tratamiento promovido por ácido y se convierten en pulpa. Una vez que el material óseo se ha convertido en pulpa, el exceso de ácido se elimina por dialización contra agua desionizada hasta que el pH sea aproximadamente 3. El extracto óseo se lava y se centrifuga a 3000 g durante 15 minutos tres veces en agua desionizada. Luego se liofiliza el sedimento para producir un polvo seco. Se reconstituyen 10 gramos de polvo liofilizado en 20 ml de agua y se mezclan con el componente líquido B del Ejemplo 1.

Ejemplo 3 - Medición de la cinética de liberación de BMP-2 a partir de gránulos bioactivos de reparación ósea

[0074] La liberación de material bioactivo de los gránulos bioactivos de reparación ósea se determina incubando 10 mg de gránulos por triplicado para cada punto temporal a 37 °C en solución salina. Como control negativo se incuban gránulos sin material bioactivo incorporado. Los gránulos se incuban durante 10 semanas en circunstancias estériles. En la primera semana se toma cada día una muestra de 100 μl de sobrenadante, seguido de un muestreo dos veces por semana en las semanas 2 a 10. Los sobrenadantes se almacenan a -80 °C hasta su análisis. Las cantidades de BMP-2 en el sobrenadante se evalúan mediante un ELISA de BMP-2 (catálogo de R&D Systems #DBP200) y se calcula la liberación acumulada de BMP-2 a lo largo del tiempo. Además, se realiza un ensayo de proteínas de Bradford (BioRad #500-0201) para medir la concentración de proteína liberada en el sobrenadante a lo largo del tiempo.

Ejemplo 4

Materiales:

[0075]

- Fosfato alfa tricálcico (tamaño de partícula <10 micrones) = Componente A
- Agua desionizada (ASTM D1193-06)
- Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, número CAS: 13472-35-0)
- Material bioactivo preparado según el ejemplo 2.

[0076] Preparar el componente B disolviendo 4 gramos de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado en 96 ml de agua desionizada. Añadir 0,02 gramos de material bioactivo, elaborado según el ejemplo 2, a la solución.

[0077] Mezclar el componente A (el polvo) y el componente B (el líquido) en una proporción de 2:1 seguido del asentamiento del material en condiciones controladas (25 °C, 75 % de humedad) durante 3 días para que alcance un estado sólido de fosfato de calcio.

[0078] Una vez que se alcanza el estado sólido el material se tritura usando una trituradora de mandíbula. Posteriormente, los gránulos así obtenidos se tamizan para obtener gránulos en un intervalo de tamaño deseado entre 250 y 2000 μm .

Ejemplo 5

Materiales:

Líquido de fraguado (componente B):

[0079]

- 4 gramos de fosfato de sodio [dihidrogenofosfato de sodio dihidratado, Merck 1.06342-0250; K95536642820]
- 96 ml de agua desionizada.

[0080] El líquido de fraguado se preparó disolviendo 4 gramos de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado en 96 ml de agua desionizada.

Gránulos:

[0081]

- 30 gramos de fosfato alfa-tricálcico (componente A) [SAMRM041218A]
- 31 mg de albúmina de suero bovino (BSA) [Sigma lote 072K1179]
- 15 ml de solución de fosfato de sodio.

[0082] Se añadieron treinta gramos de alfa-TCP y 31 miligramos de BSA a 15 ml de solución de fosfato sódico y se mezclaron bien. La mezcla se dejó reposar durante un día a 37 °C hasta alcanzar un estado sólido. El estado sólido fraguado se trituró con mortero hasta obtener gránulos.

Tampón MES:

[0083]

- 9,76 gramos MES [Sigma M8250 Lote #SLBS6258]
- 75 ml de agua desionizada

[0084] El tampón MES se preparó disolviendo 9,76 g de MES en 75 ml de agua desionizada, después se ajustó el pH a 5,5 con NaOH (10 N) y se filtró la solución resultante. Posteriormente se añadió agua hasta 100 ml y la solución se filtró nuevamente.

[0085] Se incubó un gramo de los gránulos de hidroxiapatita deficientes en calcio cargados con BSA resultantes en 5 ml de tampón MES a 37 °C. Se obtuvieron muestras de sobrenadante a los 4 y 17 días de incubación. La concentración de BSA liberada de los gránulos se evaluó mediante un ensayo cuantitativo de proteínas

mostrando una liberación gradual de BSA de los gránulos [figura 1]. Como se ilustra en el gráfico, más del 90 % de la BSA incorporada permaneció unida a los gránulos durante un período de 17 días.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para preparar un sustrato bioactivo de reparación ósea que comprende gránulos de una matriz de reparación ósea a base de fosfato cálcico y al menos un material bioactivo dispersado en el mismo, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar un polvo de fosfato cálcico, (b) proporcionar una solución acuosa que comprende un material bioactivo derivado de hueso; (c) mezclar un polvo de fosfato cálcico (a) y una solución acuosa que comprende un material bioactivo derivado de hueso (b), para obtener una mezcla, (d) permitir que la mezcla alcance un estado sólido, (e) formar gránulos a partir del estado sólido establecido, y (f) 10 seleccionar los gránulos en base al tamaño, preferiblemente gránulos que tienen un diámetro promedio entre 25 y 10 000 μm .
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde el método comprende obtener material bioactivo para el paso b) del método según los siguientes pasos; 1) desmineralizar el tejido óseo para proporcionar una matriz ósea desmineralizada de la cual se ha retirado al menos parte del contenido de calcio original del tejido; 2) someter la matriz ósea desmineralizada a un paso promovido por ácido y exponer el material de matriz ósea desmineralizada simultáneamente con, o después del paso promovido con ácido a temperaturas entre 15 °C y 85 °C, más preferiblemente entre 30 °C y 60 °C, y de la manera más preferible entre 30 °C y 35 °C, 3) 20 opcionalmente liofilizar y convertir el material en un polvo, y 4) opcionalmente resolubilizar el polvo así obtenido en un líquido acuoso.
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, donde el material bioactivo se distribuye homogéneamente a través de (d) la mezcla en estado sólido establecida.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el polvo de fosfato cálcico se selecciona del grupo que consiste en fosfato monocálcico monohidratado, fosfato dicálcico, fosfato dicálcico deshidratado, fosfato octocálcico, hidroxiapatita precipitada, fosfato cálcico amorfo precipitado, fosfato monocálcico, alfa-fosfato tricálcico (α -TCP), beta-fosfato tricálcico (β -TCP), hidroxiapatita sinterizada, oxiapatita, fosfato tetracálcico, hidroxiapatita, hidroxiapatita deficiente en calcio y combinaciones de los mismos.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, donde los gránulos se forman y seleccionan en un rango de tamaño de 50 - 5000 μm .
- 35 6. Sustrato bioactivo de reparación ósea que se puede obtener mediante el método de las reivindicaciones 1 a 5, para uso terapéutico en el tratamiento de defectos óseos en sujetos que lo necesitan.
7. Sustrato bioactivo de reparación ósea que se puede obtener según el método de las reivindicaciones 1 a 5.

Figura 1

