

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
13 de agosto de 2009 (13.08.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/098335 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61L 27/46 (2006.01) A61L 31/12 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/000060

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de febrero de 2009 (04.02.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200800390 4 de febrero de 2008 (04.02.2008) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA** [ES/ES]; CTT - Edif. 6G, Camino de Vera, s/n, E-46022 Valencia (ES). **FUNCACIÓN COMUNIDAD VALENCIAN CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRINCIPE FELIPE** [ES/ES]; Oficina de transferencia de resultados, Avenida Autopista el Saler, nº 16-3, E-46013 Valencia (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **GÓMEZ RIBELLES, José Luís** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES). **MONLEÓN PRADAS, Manuel** [ES/ES]; Universidad Politécnica de Valencia, CTT-Edif. 6G, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES). **SUAY ANTÓN, Julio José** [ES/ES]; Universidad de Valencia, OTRI, Avd. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). **LEBOURGH, Myriam** [FR/ES]; Universidad de Valencia, OTRI, Avd. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES).

(74) Mandatario: **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**; CTT - Edif. 6G, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: THREE-DIMENSIONAL MACROPOROUS SUBSTRATES FOR TISSUE ENGINEERING

(54) Título: SOPORTES MACROPOROSOS TRIDIMENSIONALES PARA INGENIERÍA TISULAR

(57) Abstract: The present invention describes a three-dimensional substrate that comprises a polymeric matrix and particles, of nanoscale or micron size, of an inorganic material that are dispersed and homogeneously distributed in said matrix. The substrate comprises a continuous network of interconnected macropores and micropores, and may further comprise a continuous biomimetic hydroxyapatite phase. The substrate is useful in tissue engineering applications. The present invention likewise describes a method for producing the substrate and the use thereof.

(57) Resumen: La presente invención describe un soporte tridimensional que consiste en una matriz polimérica y partículas de tamaño nanométrico o micrométrico de un material inorgánico dispersas y homogéneamente distribuidas en dicha matriz. El soporte comprende una red continua de macroporos y microporos interconectados, y puede comprender además una fase de hidroxiapatita biomimética continua. El soporte es útil en aplicaciones de ingeniería tisular. La presente invención describe asimismo un procedimiento para la obtención del soporte, y su empleo.



WO 2009/098335 A1

**SOPORTES MACROPOROSOS TRIDIMENSIONALES PARA INGENIERÍA
TISULAR**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del campo de la ingeniería tisular, y más particularmente se refiere a un soporte macroporoso tridimensional, que puede ser biodegradable y reabsorbible y que comprende una matriz polimérica orgánica reforzada con partículas inorgánicas dispersas en ella, y, opcionalmente, un recubrimiento de hidroxiapatita biomimética. La invención se refiere asimismo a un procedimiento para la obtención de dicho soporte, así como al empleo del mismo en aplicaciones de ingeniería tisular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La pérdida masiva de tejido óseo debido a distintas causas como pueden ser accidentes, enfermedades graves como el cáncer etc... necesita a menudo de un implante o sustituto óseo para su recuperación.

El implante de sustituto óseo más utilizado actualmente es el auto-injerto. Esta técnica sin embargo conlleva problemas como padecimiento de dolor por parte del paciente, posible necrosis en la zona de extracción del hueso y limitación en la cantidad de material óseo que es posible obtener. El uso de aloinjertos (tejido óseo de cadáver) tiene graves inconvenientes como la transmisión de enfermedades o rechazo inmunológico [Truumees E, Herkowitz HN. Alternatives to autologous bone Harvest in spine surgery. In: UPOJ volume 12 spring. 1999. p. 77-88. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, et al; Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. J Bone Joint Surg Am 1995;77-A:214-24. Friedlaender GE, Strong DM, Tomford W, Mankin HJ. Longterm follow-up of patients with

osteocondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. Orthop Clin North Am 1999;30:583-8.]

5 Frente a este tipo de estrategias cada vez cobra más importancia la ingeniería tisular que se define como la aplicación de los principios y los métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el conocimiento fundamental de las relaciones entre estructura y funciones en tejidos de mamíferos, normales y patológicos; y el desarrollo de
10 sustitutos biológicos para recuperar, mantener o mejorar la funcionalidad de los tejidos [Williams D., Materials Today (2004) 7, 24].

Las estrategias que se siguen en la ingeniería de tejidos y órganos se centran habitualmente en alguno de los
15 tres enfoques principales siguientes: terapias basadas en células [Ma P.X., Materials Today (2004) 7, 30, Rodriguez H., et al, Tissue Engineered Medical Products (Temps). ASM International, STP 1452, PA, 2004, pag. 84], terapias basadas en soportes [Langer R., Vacanti J.P., Science
20 (1993) 260, 920; Williams D., Materials Today (2004) 7, 24], y terapias basadas en moléculas bioactivas [Bloch J., Fine E.G., Bouche N., Zurn A.D., Aebischer P, Experimental Neurology (2001) 172, 425; King G.N. et al, Journal of Dental Research (1997) 76, 1460].

25 La aplicación del concepto de ingeniería tisular a la regeneración ósea ha permitido el desarrollo de distintos tipos de soportes macroporosos tridimensionales, conocidos y denominados también, de ahora en adelante, como "scaffolds", que deben servir de soporte para el
30 crecimiento del hueso (osteoconducción) e inducir la diferenciación de las células osteogénicas hacia osteoblastos y osteoclastos (osteoinducción).

Varios materiales han demostrado ser osteoconductores

(fosfatos cálcicos, vidrios bioactivos, cerámicas...). Este tipo de materiales permite un enlace directo al hueso por la similitud química con los componentes minerales de éste. Sin embargo no tienen buenas propiedades mecánicas, son frágiles y quebradizos, lo que compromete la viabilidad del implante y mucho más si el material debe ser poroso. Los materiales de este tipo disponibles en la actualidad, no ofrecen además una porosidad adecuada (ni en proporción ni en tamaño). Además la alta rigidez de las cerámicas macizas o poco porosas puede traer consigo la aparición del fenómeno de protección de cargas lo que es nefasto para el implante y su entorno.

Por otra parte se han desarrollado materiales poliméricos con propiedades mecánicas más próximas al tejido óseo que se quiere restituir, "scaffolds", de estructura y morfología similar al hueso que se quiere hacer proliferar. Aunque existe una gama de polímeros bioreabsorbibles, biocompatibles y de aplicación en contacto con el tejido óseo, estos materiales no son capaces de establecer enlaces químicos directos con el hueso. Este tipo de planteamiento está descrito en la patente US2003008395, pero el "scaffold" de PLGA divulgado, aunque tenga una estructura porosa abierta, no tiene características osteoinductoras.

Por las razones previamente expuestas, en este campo últimamente la atención se dirige a los materiales compuestos de una matriz polimérica y cargas inorgánicas en distintas proporciones. Se puede tratar de partículas cerámicas bioactivas en proporción media o elevada (en implantes porosos hasta un 60%) en una matriz polimérica como muestra la patente WO9846164, o bien de una gran cantidad de partículas con una mínima proporción de

material orgánico como agente ligante (binder) tal como muestra la patente US4192021. Otras patentes que proponen diversos materiales compuestos son US5017627 que divulga un material poliolefínico no biodegradable con partículas inorgánicas; US5552454 que divulga ceras y resinas poliméricas con cerámicas biocompatibles. Las patentes mencionadas consideran el uso de los materiales mencionados para la obtención de soportes macroporosos, pero no describen técnicas de síntesis de los mismos, ni como conseguir obtener las morfologías en el soporte que se necesitan para la regeneración efectiva del hueso (porosidad, tamaño de poro, superficie efectiva etc...).

La mayoría de las cargas inorgánicas utilizadas en los materiales descritos, como cerámicas, fosfatos cálcicos etc., tienen aún en forma nanométrica, una bioactividad limitada. Un nuevo enfoque biomimético ha visto la luz, inspirado por los trabajos de P. Ma, Kokubo et al [Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solution able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. J Biomed Mater Res 1990;24:723-34; Oyane A, Kawashita M, Nakanishi K, Kokubo T, Minoda M, Miyamoto T, Nakamura T. Bonelike apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with silane coupling agent and calcium silicate solutions. Biomaterials 2003;24:1729-35; Oyane A, Kawashita M, Kokubo T, Minoda M, Miyamoto T, Nakamura T. Bonelike apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with a silane coupling agent and titania solution. J. Ceram. Soc. Japan 2002;110:248-54. Kawashita M, Nakao M, Minoda M, Kim HM, Beppu T, Miyamoto T, Kokubo T, Nakamura T. Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid. Biomaterials 2003;24:2477-84]. Se trata de hacer precipitar sobre los soportes

macroporosos desarrollados los minerales desde un fluido corporal simulado (SBF), tal como ocurre en el cuerpo humano sobre distintos tejidos. Se ha desarrollado una técnica de recubrimiento de los soportes con hidroxiapatita biomimética que vale en todos los materiales que tengan grupos funcionales de tipo hidroxilo tales como los carboxilos, silanoles, TiOH, etc. Los resultados publicados (Preparation of bonelike apatite composite for tissue engineering scaffold; Hirotaka Maedaa, Toshihiro Kasuga, Masayuki Nogamia, Minoru Ueda, Science and Technology of Advanced Materials 6 (2005) 48-53) permiten intuir que las propiedades biológicas de la hidroxiapatita así obtenida son significativamente mejores que las de los fosfatos cálcicos o apatitas sintéticas tradicionales. Las causas que explican estos mejores resultados son variadas. Entre otras el pequeño tamaño de los cristales, que favorece la redisolución de los mismos en el organismo. Se trata éste de un fenómeno que no se observa con las apatitas sintéticas sinterizadas a altas temperaturas, que son altamente estables y no se descomponen. Otra causa es que la composición química de este tipo de apatita es mucho más similar a la del hueso natural.

Se conocen en el estado de la técnica diversas solicitudes de patentes, que describen la preparación de "scaffolds" con características muy diversas que se obtienen mediante el uso de variados procesos de fabricación y materiales para la regeneración ósea.

La solicitud US2003082808 divulga un soporte macroporoso polimérico con una red de macroporos interconectados que presentan un diámetro comprendido entre 0,5-3,5mm, preferentemente entre 1-2mm. Este soporte se prepara mediante un procedimiento que comprende la

combinación de las técnicas de disolución selectiva e inversión de fase, que proporciona control sobre la morfología del soporte formado; tiene utilidad en el campo de la ingeniería tisular, particularmente como soporte para crecimiento de células *in vitro* e *in vivo*. La superficie del soporte puede ser modificada por ejemplo por deposición de partículas de fosfato cálcico resorbibles por osteoclastos. Sin embargo, este soporte presenta, entre otras, la desventaja de que su biocompatibilidad es limitada.

La solicitud US2004/191292 divulga un material compuesto, y su uso en el campo de la ingeniería biomédica, donde el material compuesto comprende micropartículas bioactivas que podrían inducir al tejido óseo humano a regenerarse. El soporte usa la combinación de micropartículas de sílice, calcio, fósforo como sustancias bioactivas que podrían inducir activamente la proliferación y diferenciación de los osteoblastos humanos, promoviendo la formación y la calcificación del hueso nuevo. El soporte comprende una estructura tridimensional y una forma externa anatómica de acuerdo con los requerimientos para la regeneración de hueso y la vascularización. Sin embargo, el volumen de micropartículas incluidas tiene que ser muy elevado para que tenga lugar un efecto osteoinductivo suficiente en la superficie.

La solicitud US2005255159 describe una composición porosa que comprende un material hidroxapatita (HAp), obtenido a partir de una mezcla de fosfato cálcico, óxido de calcio y un porógeno inorgánico que puede ser eliminado del soporte una vez formado. Éste es totalmente inorgánico, no comprende fase orgánica, por lo que su resiliencia

mecánica y resistencia a la fractura son limitadas, más aún teniendo en cuenta las porosidades alcanzadas. Además su capacidad de ser biodegradado también es limitada.

5 De todo lo expuesto anteriormente, resulta evidente, que ninguno de los soportes macroporosos tridimensionales descritos en el estado de la técnica, cumple con todos los requisitos necesarios y deseables para su aplicación eficaz y satisfactoria en ingeniería tisular. Por lo tanto, sigue
10 existiendo la necesidad de proporcionar soportes macroporosos tridimensionales alternativos, que superen al menos parte de las desventajas de los soportes del estado de la técnica.

15 En este sentido los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente un nuevo soporte tridimensional que presenta unas propiedades especialmente adecuadas para su uso en aplicaciones de ingeniería tisular. El soporte presenta una morfología,
20 caracterizada por la co-existencia de macroporos y microporos continuamente interconectados entre sí como se representa en la Figura 5 (izq). El soporte tridimensional está formado por una matriz constituida por un polímero orgánico y en la que se encuentran homogéneamente dispersas
25 partículas de un material de refuerzo. La superficie tanto de los macroporos como de los microporos, puede activarse mediante un procedimiento adecuado, convirtiendo el soporte tridimensional en un soporte tridimensional bioactivo. En este sentido, dicho soporte tridimensional bioactivo es
30 capaz de generar, bien cuando se implanta "in vivo" o bien en condiciones equivalentes "in vitro", un recubrimiento de hidroxiapatita biomimética continuo que recubre todas las superficies internas de los macroporos y de los microporos

dando lugar a un soporte híbrido con una estructura interpenetrada de polímero-hidroxiapatita biomimética como se representa en la Figura 5 (der).

5 El soporte tridimensional de la presente invención, que se describe en detalle a continuación, resulta especialmente apropiado para su empleo en ingeniería tisular ya que permite el crecimiento de células y su vascularización, esencial para el desarrollo de tejido
10 funcional y tridimensional. En concreto una de las aplicaciones en la cual resulta de gran utilidad es la fabricación de tiras de fusión intervertebral.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: microfotografías SEM de a) una matriz de policaprolactona sin recubrimiento de hidroxiapatita biomimética; y b) detalle de la estructura de los microporos de la matriz de policaprolactona.

20 **Figura 2:** microfotografías SEM de a) una matriz de policaprolactona en la que se observa el recubrimiento de hidroxiapatita biomimética; b) del detalle de la estructura del recubrimiento; c) y d) detalle del crecimiento de hidroxiapatita biomimética en el interior de los
25 microporos.

Figura 3: microfotografía SEM del recubrimiento continuo de hidroxiapatita biomimética después de pirolizar la matriz polimérica.

30 **Figura 4:** Microfotografía SEM de una matriz de policaprolactona reforzada con nanopartículas (diámetro medio 100 nm) de hidroxiapatita dispersas en la matriz polimérica.

Figura 5: Representación del soporte macroporoso antes

(izq.) y después (der.) de su recubrimiento con hidroxiapatita biomimética donde (m) indican microporos y (M) macroporos; y donde (HAp-m) y (HAp-M) indican microporos y macroporos recubiertos respectivamente.

5

Figura 6: Tiras de fusión intervertebral de policaprolactona bioactiva obtenidas por el procedimiento de la invención.

10

Figura 7: muestra el resultado de un análisis de microscopia electrónica en modo EDX de una muestra recubierta de hidroxiapatita biomimética según el procedimiento descrito (soporte híbrido): muestra los átomos constitutivos de la capa depositada de hidroxiapatita y el análisis de la composición química.

15

Figura 8: microfotografía SEM que muestra un soporte híbrido (matriz polimérica con recubrimiento de HAp biomimética) después de su calcinación.

OBJETO DE LA INVENCION

20

En un aspecto la presente invención se refiere a un nuevo soporte tridimensional que consiste en una matriz polimérica y partículas de tamaño nanométrico o micrométrico de un material inorgánico, dispersas en dicha matriz y homogéneamente distribuidas. El soporte tiene una morfología que presenta una red de macroporos perfectamente interconectados entre sí de tamaño comprendido entre 50 y 1000 micras, y adicionalmente una segunda red de microporos también interconectados entre sí, y con los macroporos, de tamaño comprendido entre 1 y 10 micras. El soporte presenta una porosidad en volumen comprendida entre un 50 y un 95%.

30

En una realización particular dicho soporte tridimensional, en adelante soporte de la invención, se

encuentra activado como se detalla en la descripción. Dicho soporte activado se denomina de ahora en adelante soporte bioactivo.

5 En otra realización particular, el soporte de la invención comprende, además, una fase inorgánica que consiste en un recubrimiento de HAp biomimética, y al que la descripción en adelante denomina soporte híbrido.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a un nuevo procedimiento de obtención del soporte de la invención. El procedimiento comprende las etapas de: disolución de un polímero en un primer disolvente, adición de partículas de refuerzo y su dispersión con técnicas de ultrasonidos en el
15 medio líquido, adición de porógeno; brusca solidificación de la mezcla por enfriamiento, manteniendo la homogeneidad de la dispersión del material de refuerzo y evitando su aglomeración; extracción con un segundo disolvente adecuado del primer disolvente solidificado; disolución y retirada
20 del porógeno.

Otro aspecto adicional de la invención, se refiere a un soporte obtenible según el procedimiento de la invención.

25 En otro aspecto la invención se refiere a un soporte para su uso en generación o regeneración de tejido.

Por tanto, asimismo la invención se refiere al empleo del soporte de la invención para la generación o regeneración de tejido, por ejemplo tejido conectivo, como
30 hueso o cartílago.

En otro aspecto adicional la invención se relaciona con un procedimiento para generar o regenerar tejido que comprende obtener un soporte bioactivo o un soporte híbrido según la invención, y cultivar en dicho soporte células de un tejido seleccionado. Opcionalmente el procedimiento puede comprender asimismo la siembra con células del soporte.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención se refiere a un soporte tridimensional que consiste en una matriz polimérica y partículas de refuerzo dispersas en dicha matriz, de tamaño nanométrico o micrométrico de un material inorgánico adecuado, y homogéneamente distribuidas en la matriz (Figura 4).

La ventaja de este soporte, que lo hace especialmente eficaz en aplicaciones tisulares, reside en la morfología del mismo ya que presenta una red de macroporos perfectamente interconectados entre sí de tamaños comprendidos entre 50 y 1000 micras, y adicionalmente una segunda red de microporos también interconectados entre sí, y con los macroporos, de tamaño comprendido entre 1 y 10 micras (Figura 1). El soporte presenta una porosidad en volumen entre 50 y 95% y una elevada superficie específica. Esta morfología confiere ventajas al nuevo soporte, y permite la activación de las superficies de los microporos y macroporos, que facilita y acelera la generación de un recubrimiento de HAp biomimética como se describe más adelante. La Figura 1 muestra la doble estructura porosa de una matriz polimérica de PLC con macroporos y microporos interconectados entre sí. La imagen de microscopía electrónica de barrido SEM (Figura 1) corresponde a una fractura criogénica de una matriz de policaprolactona. Los

microporos se observan claramente en la sección de fractura. También se observa claramente la perfecta interconexión entre los macroporos con gargantas de conexión de tamaños de diámetro medios superiores a los 100 μm . La morfología de la estructura tanto en lo que respecta a la fracción en volumen de macroporos, microporos, sus tamaños o el tamaño de las gargantas de conexión entre poros pueden controlarse durante el procedimiento de obtención variando la composición química y los parámetros del procedimiento.

El polímero que se utiliza en la presente invención puede ser biodegradable. La matriz polimérica puede comprender cualquier polímero convencional, preferentemente biocompatible, y reabsorbible, en particular, cuando la matriz se destina a aplicaciones fisiológicas. El término "biocompatible" se refiere en la presente invención a que no sea tóxico y a que permita a las células colonizarlo. El término "reabsorbible" en la presente invención se refiere a que el soporte desaparezca en el tiempo cuando se encuentra en el interior de un cuerpo animal a medida que es sustituido por tejido regenerado. El polímero debe seleccionarse de modo que pueda activarse superficialmente mediante la creación de núcleos de cristalización, inductores de la posterior cristalización de hidroxiapatita biomimética. Es decir, el polímero debe comprender grupos hidroxilo, tales como grupos carboxilos, silanoles, TiO_2 entre otros y sus mezclas. En el contexto de la presente invención "hidroxiapatita biomimética" se refiere a la hidroxiapatita que se deposita de forma natural "in vivo" o que se deposita sumergiendo el soporte en una solución equivalente que reproduce las condiciones in vivo, de la misma composición salina que el plasma humano (Simulated

Body Fluid o SBF) durante el tiempo necesario. Entre dichos polímeros y sólo con carácter ilustrativo se pueden mencionar, entre otros, policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), copolímeros ácido láctico y ácido glicólico (PLGA), copolímeros de ácido láctico y etilenglicol (PLLA-co-PEG), copolímeros de lisina ácido láctico, (PPF), copolímeros de etilenglicol y ácido fumárico, polipropilénfumarato, así como sus mezclas. En una realización preferente la matriz polimérica comprende un polímero aprobado para su uso clínico, como por ejemplo policaprolactona (PCL).

La matriz polimérica comprende partículas de un material inorgánico adecuado o material de refuerzo, que pueden ser entre otros, hidroxiapatita, fluorohidroxiapatita, disiliciuro de calcio, fosfato cálcico, y sus mezclas. En general el tamaño de dichas partículas está comprendido entre 50-300nm. En una realización preferente las partículas presentan un tamaño inferior a 100nm de modo que su efecto como refuerzo mecánico del soporte y su biodegradabilidad son mayores. Algunas nanopartículas pueden observarse en la superficie de la matriz polimérica antes de su recubrimiento con HAp (Figura 4). Las características del soporte tridimensional de la invención, varían en función de su composición química; presentan porosidades comprendidas entre 50-95%, preferiblemente iguales o superiores al 70%; módulos elásticos entre 0,1MPa y 100MPa, y velocidades de degradación *in vitro* comprendidas entre 4 y 12 meses. Las características del soporte de la invención pueden variarse de forma sencilla por un experto en la materia dentro de los intervalos descritos para adaptarse a las necesidades requeridas por la aplicación concreta.

En una realización particular el soporte de la invención es un soporte bioactivo. El soporte bioactivo se obtiene como se explica más abajo en la descripción, y se refiere a un soporte según la invención en el que las superficies de microporos y macroporos presentan núcleos de cristalización, inductores de la cristalización de hidroxapatita, preferiblemente HAp biomimética.

En el contexto de la presente invención el término "bioactivo" referido al soporte, se refiere a la capacidad del soporte de inducir la proliferación y diferenciación de osteoblastos, de inducir la formación y calcificación de hueso nuevo, y a la capacidad de restituir la función fisiológica a nivel molecular y celular. Esta capacidad bioactiva se puede demostrar si el soporte se implanta in vivo, o alternativamente como en la presente invención, aplicando el método convencional aceptado en este campo de la técnica, que consiste en sumergir el soporte bioactivo en una solución de fluido corporal simulado, que simula el plasma sanguíneo y observar como tiene lugar el crecimiento de un recubrimiento de HAp biomimética.

En otra realización particular el soporte de la invención es un soporte híbrido, constituido por el soporte tridimensional anteriormente descrito, y un recubrimiento continuo y homogéneo de hidroxapatita biomimética en la superficie de los macroporos y microporos. La adherencia a la matriz polimérica de la hidroxapatita biomimética es muy elevada y consigue conferir al soporte buenas propiedades mecánicas y propiedades de osteointegración y osteoinducción. La estructura del soporte híbrido, se observa en las Figuras 2a y 2b en las que se muestra claramente que la matriz polimérica, y la fase de

hidroxiapatita biomimética se entremezclan a nivel microscópico y de manera altamente interpenetrada. Tanto la matriz polimérica como la hidroxiapatita constituyen fases continuas. Esta continuidad, se pone de manifiesto en la Figura 3 que muestra una microfotografía SEM de un soporte híbrido después de haber pirolizado la matriz polimérica, quedando sólo la fase de HAp biomimética.

El nuevo soporte de la invención puede moldearse en el tamaño y geometría deseado, dependiendo de la aplicación a la que se destine; es biocompatible, osteoinductor, osteoconductor, y preferiblemente es biodegradable y biorreabsorbible. Debido a su elevada superficie específica, y su morfología, la bioactividad es también muy elevada lo cual constituye una ventaja importante, por ejemplo, en el campo de la regeneración ósea. La alta superficie específica está asociada además con una alta reactividad del soporte, y los procesos de disolución/precipitación de minerales que constituyen la HAp biomimética se ven favorecidos y acelerados. Además estos fenómenos están ligados con la precipitación de sustancias orgánicas de importancia para la diferenciación de células osteogénicas, tales como diversas proteínas y citokinas. La morfología es especialmente ventajosa ya que además de la elevada superficie específica debida a la microporosidad, la presencia y el tamaño de macroporos permite la entrada de células, y la vascularización de tejidos.

En otro aspecto la invención proporciona un procedimiento para obtener un soporte según la invención que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto en un molde una disolución de un

polímero en un primer disolvente y partículas de tamaño nanométrico o micrométrico de un material inorgánico y agitar la mezcla por ultrasonidos;

5 (ii) añadir partículas de porógeno de un tamaño comprendido entre 50 y 1000µm y homogenizar la mezcla resultante;

(iii) congelar la mezcla homogénea hasta obtener una pieza solidificada;

10 (iv) extraer en frío el primer disolvente de la pieza solidificada por disolución sumergiéndola en un segundo disolvente;

(v) extraer a temperatura ambiente las partículas de porógeno sumergiendo la pieza en un tercer disolvente que disuelve dichas partículas de porógeno;

15 (vi) obtener un soporte polimérico con partículas de refuerzo.

En las etapas (i) y (ii) se prepara una disolución de un polímero en una concentración generalmente comprendida entre 10% al 40% en peso de polímero con respecto al peso
20 total de la disolución. Dicho porcentaje en peso varía según el tipo de polímero y de disolvente usado. El disolvente puede ser en principio cualquier disolvente orgánico adecuado capaz de disolver el polímero como por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de metileno, acetato de etilo, cloroformo, n-heptano, n-hexano, n-pentano, dioxano, benceno, xileno, acetona, naftaleno y sus
25 mezclas. En una realización particular el disolvente es dioxano.

El material porógeno puede ser monosacáridos o
30 polisacáridos como glucosa, azúcar, sales orgánicas, sales inorgánicas, microesferas acrílicas, microfibras

poliméricas en la proporción y el tamaño adecuado según la macroporosidad que se quiere obtener. Típicamente dicha proporción está comprendida entre 40/60 a 70/30 en peso de partículas de porógeno con respecto al peso de disolución.

5 El tamaño del diámetro de las partículas de porógeno generalmente está comprendido entre 50 y 1000 micras, preferentemente entre 100 y 300 μm . Las partículas de refuerzo se añaden primero a la disolución de polímero, la cual se homogeneiza con ultrasonidos antes de mezclar con
10 las partículas de porógeno; de este modo se evita que se aglomeren o acumulen en determinadas partes del soporte de la invención.

La mezcla homogénea constituida por un polímero en un primer disolvente, las partículas de refuerzo y las
15 partículas de porógeno se introduce en un molde, con la forma y dimensiones de la pieza de soporte que se desee obtener. Asimismo, para formas no complejas de scaffold se pueden utilizar después de su obtención, diversas herramientas de corte para obtener la geometría deseada.
20 Por ejemplo en la figura 6 se muestra una tira de fusión intervertebral generada según el procedimiento de la invención.

El molde tiene que soportar el disolvente orgánico y los cambios bruscos de temperatura durante el
25 procedimiento, por lo cual tiene que ser estable química y térmicamente. Generalmente se utiliza un molde de resina, de politetrafluoroetileno (PTFE) teflón o metal. En general se cierra el molde, y la mezcla homogénea en el molde cerrado se somete a la siguiente etapa.

30 En la etapa (iii) la mezcla homogénea se congela de modo que se estabiliza, hasta obtener una pieza

solidificada. La congelación puede hacerse de forma convencional por ejemplo mediante la inmersión del molde cerrado con la mezcla en un recipiente con nitrógeno líquido o simplemente por su introducción en un dispositivo a temperatura inferior a la solidificación del primer disolvente utilizado. La temperatura de congelación varía en función de la naturaleza del primer disolvente utilizado con el polímero. La pieza solidificada se desmoldea a continuación rápidamente para posteriormente extraer el primer disolvente con un segundo disolvente en frío.

En la etapa (iv) se extrae el primer disolvente de la pieza solidificada en frío sumergiéndola en un segundo disolvente que se encuentra a una temperatura, que en una realización particular es de -20°C . La extracción tiene lugar por difusión en frío, de modo que la temperatura del primer disolvente no exceda la de su punto de fusión y éste pase directamente del estado cristalizado, a estar disuelto en dicho segundo disolvente. Este segundo disolvente puede ser en principio cualquier disolvente orgánico, inorgánico y sus mezclas convencionales. La selección del mismo puede realizarse fácilmente el experto en la materia, en función del primer disolvente. Durante la extracción del primer disolvente, el segundo disolvente puede renovarse varias veces sumergiendo la pieza en disolvente fresco para disminuir el tiempo necesario para que el primer disolvente se difunda por completo fuera de la pieza solidificada. La extracción tiene lugar durante el tiempo necesario para permitir la difusión de todo el primer disolvente de la matriz polimérica. En una realización particular dicho disolvente se selecciona de entre etanol y mezclas de etanol-agua. Asimismo, es posible realizar una extracción del disolvente del soporte al menos de forma parcial por

sublimación gracias a la aplicación de presiones lo más cercanas al vacío posible

A continuación, en la etapa (v), la pieza solidificada se lleva a temperatura ambiente, y las partículas de porógeno se extraen sumergiendo la pieza en un tercer disolvente capaz de disolver dichas partículas de porógeno. Dicho tercer disolvente puede renovarse para extraer completamente el porógeno. En una realización particular dicho tercer disolvente puede ser, entre otros, etanol, agua, acetona, y sus mezclas. La matriz polimérica resultante de esta etapa se lava y seca para obtener el soporte de la invención (etapa (vi)).

En una realización particular del procedimiento de la invención, el procedimiento comprende además una etapa de tratamiento de activación superficial del soporte, en la que se forman núcleos distribuidos por las superficies de los macroporos y de los microporos. Dichos núcleos son inductores de la cristalización posterior de HAp biomimética. El soporte obtenido es un soporte bioactivo.

Como prueba de que la activación de la superficie del soporte tiene lugar y conduce a la formación de núcleos inductores de cristalización en SBF, se introduce el soporte bioactivo de nuevo en SBF y se deja cristalizar la hidroxiapatita biomimética un tiempo comprendido entre unos días a dos semanas. Cuanto mayor sea el tiempo de cristalización mayor será el espesor de la capa de recubrimiento de hidroxiapatita biomimética depositada. En el fluido corporal simulado (equivalente y que reproduce las condiciones in vivo en las que el soporte bioactivo se implanta) crece una capa de hidroxiapatita biomimética. En

este sentido se utiliza un fluido corporal simulado con la composición del plasma sanguíneo, descrita por Kokubo (Biomaterials 27 (2006) 2907-2915- How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Tadashi Kokubo, Hiroaki Takadama). La figura 2 muestra microfotografías SEM de la superficie interna del soporte recubierto. Esta fase de hidroxiapatita biomimética es tan continua y eficaz (Figura 2c y 2d) que cuando se elimina por completo la matriz polimérica mediante pirólisis, tratamiento que no afecta a la fase de hidroxiapatita biomimética, la estructura de ésta permanece inalterada y continua (Figura 3). Esto se debe a la penetración del recubrimiento de hidroxiapatita biomimética en los microporos, lo que da continuidad a la fase de hidroxiapatita biomimética y la ancla firmemente a la matriz polimérica (Figuras 2c y 2d).

El tratamiento para activar la superficie de los macro y microporos, para opcionalmente, llevar a cabo una cristalización posterior de hidroxiapatita biomimética bien in vivo o in vitro, comprende las siguientes etapas:

- 1) tratamiento del soporte por exposición a un plasma de un gas o por inmersión en una disolución de hidróxido sódico.
- 2) inmersión el soporte obtenido en 1) alternativamente en soluciones que contienen respectivamente Ca^{2+} o PO_4^{3-} .
- 3) inmersión del soporte obtenido en 2) en fluido corporal simulado (SBF).

La etapa 1) introduce en la superficie de los macro- y microporos grupos funcionales que contienen grupos hidroxilo, como el carboxilo, silanol, hidróxido de

titanio, entre otros, y sus mezclas. El gas puede ser entre
 otros, argón, nitrógeno u oxígeno. A continuación en la
 etapa 2) se generan núcleos de fosfato cálcico en la
 superficie de los microporos y macroporos del soporte
 5 caracterizado por su elevada superficie específica,
 mediante la inmersión alternada del soporte obtenido en 1)
 en soluciones conteniendo respectivamente Ca^{2+} o PO_4^{3-} , por
 ejemplo cloruro cálcico y fosfato de potasio. En la etapa
 3) el soporte obtenido en 2) se sumerge en un fluido
 10 corporal simulado (SBF) por un periodo típicamente inferior
 a 24 horas para crear los núcleos inductores de
 hidroxiapatita a fin de que pueda existir posteriormente la
 cristalización de hidroxiapatita biomimética una vez que el
 soporte se haya implantado.

15 En una realización preferente se utiliza la siguiente
 composición del SBF tamponada con ácido clorhídrico e
 hidrocloreuro de tris (hidroximetil)aminometano (disolución
 de Kokubo modificada):

componente	g/L
NaCl	136,8
KCl	3
$\text{CaCl}_2 \times 6$	
H_2O	2,5
$\text{MgCl}_2 \times 6$	
H_2O	1,5
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10$	
H_2O	0,5
NaHCO_3	4,2
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3$	
H_2O	1

20 En otra realización particular, el procedimiento de la
 invención comprende además una etapa de recubrimiento de
 las superficies internas de los macro- y microporos, del

soporte, o del soporte bioactivo en un fluido corporal simulado (SBF). El soporte se sumerge durante un tiempo típicamente comprendido entre 24 horas y 2 semanas. Dependiendo del tiempo se genera un recubrimiento de hidroxapatita de espesor variable (tanto mayor cuanto más tiempo de deposición) que recubre totalmente la superficie de macro y microporos. Se obtiene así un soporte híbrido con una estructura interpenetrada según se describe e ilustra en la invención.

Los soportes bioactivos o híbridos de la invención son adecuados para su aplicación en ingeniería tisular. En un aspecto la invención proporciona por tanto, un soporte para su uso en la generación o regeneración de tejido.

Además los inventores han observado que después de dos semanas en SBF concentrado (SBFx2), se observó una deposición mineral consecuente, que representa para todas las muestras ensayadas, tanto scaffolds de polímero puro como de polímeros reforzados con micropartículas de hidroxapatita, un aumento de su peso de al menos 25%. Es de destacar que la alta superficie específica de las muestras, debida a la microporosidad, permite una deposición óptima de los minerales.

Asimismo, en otro aspecto la invención se refiere al empleo del soporte de la invención en generación o regeneración de tejido. En una realización particular se emplea un soporte bioactivo o híbrido. La generación o regeneración de tejido incluye la reparación o sustitución de hueso, tiras de fusión intervertebrales, implante de prótesis en tejido óseo in vivo, entre otras.

El tejido puede ser por ejemplo tejido conectivo, como hueso o cartílago. Los soportes bioactivos y los soportes híbridos se utilizan in vivo o in vitro.

5 En otro aspecto adicional la invención se relaciona por tanto con un procedimiento para generar o regenerar tejido que comprende:

proporcionar un soporte bioactivo o un soporte híbrido según la presente invención, y

10 cultivar in vitro en dicho soporte células de un tejido seleccionado,

y opcionalmente implantar el soporte obtenido en la etapa anterior en un humano o animal.

15 Opcionalmente el procedimiento puede comprender además una siembra con células del soporte previo a su cultivo e implante.

Se pueden usar células diferenciadas como osteoblastos, así como células pluripotenciales como las de la médula ósea en conjunto con señales químicas tal como el factor de crecimiento de hueso GMP1.

20 Asimismo la presente invención se relaciona con un método de tratamiento para la generación o regeneración de un tejido en un sujeto que comprende implantar un soporte bioactivo o un soporte híbrido en dicho sujeto en necesidad del mismo, donde sujeto es un animal incluido el ser humano. Como se ha mencionado arriba el soporte puede haber sido tratado previamente a su implantación cultivando in vitro el soporte con las células de interés, y/o
25 sembrándolo con dichas células.
30

A continuación se presentan ejemplos ilustrativos de la invención que se exponen para una mejor comprensión de

la invención y en ningún caso deben considerarse una limitación del alcance de la misma.

EJEMPLOS

5

Ejemplo 1

Procedimiento de obtención de un soporte reforzado bioactivo según la invención

1. Preparación del soporte (scaffold)

10 Se preparó una disolución al 20% en peso de policaprolactona (PCL) en dioxano. Se añadió a continuación un 10% en peso (con respeto al peso de PCL) de partículas de HAp de 100 nm de diámetro a la disolución de PCL, que se dispersaron mediante exposición a ultrasonidos durante
15 media hora.

Posteriormente la disolución anterior se mezcló con sacarosa en proporción 5/6 en peso (disolución/azúcar), después de haber tamizado el azúcar para obtener un tamaño de partícula de entre 200-300 micras. La mezcla resultante
20 se colocó en un molde de teflón que se sumergió en nitrógeno líquido durante cinco minutos. A continuación se vertió etanol frío a una temperatura de -10°C en el molde y el molde se colocó en el congelador a una temperatura de -10°C. Se cambió el etanol tres veces y se dio la vuelta a
25 la pieza para que difundiera todo el dioxano fuera de ella. Después de dos días, se sacó la pieza del congelador, se limpió con etanol y se puso en agua para disolver el azúcar, a temperatura ambiente. Se cambió el agua tres veces, y al cabo de tres días se sacó y se procedió al
30 secado.

2. Preparación del soporte activado

El soporte se sumergió en una disolución 1 molar de sosa durante un día. Para asegurar que la sosa penetrara bien en todos los microporos del soporte, se sometió la estructura a ciclos de despresurización y presurización sucesivos hasta que no salieron más burbujas del soporte. Se dejó un día a temperatura ambiente y se lavó con agua destilada.

Inmediatamente la estructura se sumergió durante diez segundos en cloruro cálcico de concentración $0,05\text{mol.L}^{-1}$, y se aclaró con agua destilada. A continuación se sumergió durante diez segundos en fosfato de potasio $0,05\text{mol.L}^{-1}$, y se aclaró con agua destilada. Este ciclo se repitió cinco veces. Después se colocó la estructura en un frasco de vidrio con fluido corporal simulado (Simulated Body Fluid o SBF; composición y concentraciones indicadas arriba en la descripción de la invención). Se dejó que cristalizara la hidroxiapatita durante dos horas. Después se lavó con agua destilada y se secó.

De esta forma se obtuvo el soporte activado que constituye la base para fabricar cualquier tipo de scaffold híbrido. La geometría del material obtenido depende del molde seleccionado.

Ejemplo 2.

Procedimiento de obtención y estudio de las propiedades de un scaffold híbrido.

Se prepararon varios soportes según la invención, variando las proporciones de PCL en dioxano entre un 10 a un 20% en peso. Además se mezcló la disolución con varias proporciones de porógeno/disolución (de entre 4/5 a 5/4)

Las muestras (soportes) obtenidas se analizaron para ver la influencia de los parámetros indicados en la porosidad resultante del soporte. El porógeno utilizado es polietilmetacrilato (PEMA).

5

Se ha comprobado que la concentración de la disolución influencia la cantidad y morfología de los microporos, mientras la cantidad de porógeno influencia la cantidad de macroporos y la interconexión entre estos. Los valores mecánicos son muy sensibles al aumento de macroporosidad, obteniéndose muestras muy blandas si la porosidad es elevada.

10

En la siguiente tabla se describe las diferentes muestras de soporte que se han fabricado y la porosidad en % de volumen obtenida:

15

porógeno	disolución	porógeno/disolución	porosidad
PEMA	20%	5//4	86,4
PEMA	10%	4//5	90,7
PEMA	10%	5//5	91,5
PEMA	10%	5//4	92,6

20

25

A las diferentes muestras fabricadas de soportes, se les aplicó el procedimiento de activación superficial, y para simular la situación del scaffold una vez implantado, se dejó que cristalizara hidroxapatita biomimética durante dos semanas, cambiando el SBF a la semana para suplir la pérdida de especies iónicas en el medio debido a la deposición.

Se llevó a cabo un análisis elemental de la superficie de los scaffolds utilizando microscopia electrónica en modo

EDX, en el que se analizan los rayos X emitidos por la muestra durante la desexcitación después de la colisión con los electrones primarios. Estos rayos X son característicos de los átomos constitutivos de la muestra y analizan con precisión la composición química de la capa depositada de hidroxapatita. Los resultados obtenidos en todas las muestras con diferente composición y tiempo de inmersión en SBF muestran, como se observa en la Figura 7 impurezas como magnesio, sodio, y cloruros, que han cristalizado junto al fosfato cálcico; eso es típicamente el caso en la hidroxapatita del hueso, mientras la hidroxapatita sintetizada en laboratorio y sinterizada suele estar pura, altamente cristalizada, lo que dificulta su reabsorción una vez implantada.

En la microfotografía SEM (Figura 8) se puede observar un scaffold de policaprolactona recubierta de hidroxapatita biomimética, siguiendo el procedimiento de activación explicado más arriba y sumergida en SBF 3 semanas y posteriormente calcinado por calentamiento hasta una temperatura de 1000°C. Se observa que después de calcinar esta muestra el residuo mantiene su integridad física, prueba de que las dos fases están altamente interpenetradas y interconectadas.

REIVINDICACIONES

1. Un soporte tridimensional que consiste en una matriz polimérica que comprende partículas de tamaño nanométrico o micrométrico de un material inorgánico dispersas y homogéneamente distribuidas en dicha matriz polimérica.
2. Soporte según la reivindicación 1, que presenta una doble estructura porosa con una red de macroporos interconectados entre sí de tamaño comprendido entre 50 y 1000 micras con gargantas de conexión entre los macroporos de tamaños de diámetro medios superiores a 100 μm , y una segunda red de microporos interconectados entre sí, y con los macroporos, de tamaño comprendido entre 1 y 10 micras.
3. Soporte según la reivindicación 1 o 2, que presenta una porosidad en volumen comprendida entre un 50 y 95% y un módulo elástico comprendido entre 0,1MPa y 100MPa.
4. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polímero de la matriz polimérica es biocompatible.
5. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polímero comprende grupos hidroxilo.
6. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en el que el polímero se selecciona de entre policaprolactona, ácido poliláctico, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, copolímeros de ácido láctico y etilenglicol, copolímeros de lisina y ácido láctico, copolímeros de etilenglicol y ácido fumárico,

polipropilénfumarato y sus mezclas.

7 Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el polímero es policaprolactona.

5

8. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que las partículas de tamaño nanométrico o micrométrico son de hidroxiapatita, fluorohidroxiapatita, disiliciuro de calcio, fosfato cálcico y sus mezclas.

10

9. Soporte según la reivindicación 8, en el que las partículas presentan un tamaño comprendido entre 50-300nm.

10. Soporte según la reivindicación 9, en el que las partículas presentan un tamaño inferior a 100nm

15

11. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende además en las superficies de los microporos y macroporos núcleos inductores de la cristalización de hidroxiapatita.

20

12. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además de la matriz polimérica un recubrimiento continuo y homogéneo de hidroxiapatita biomimética en la superficie de los macroporos y microporos.

25

13 Un procedimiento para obtener un soporte según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las etapas de:

30

(i) poner en contacto en un molde una disolución de un polímero en un primer disolvente y partículas de refuerzo de tamaño nanométrico o micrométrico de un

material inorgánico y agitar la mezcla por ultrasonidos;

(ii) añadir partículas de porógeno de un tamaño comprendido entre 50 y 1000µm y homogenizar la mezcla resultante;

5 (iii) congelar la mezcla homogénea hasta obtener una pieza solidificada;

(iv) extraer en frío el primer disolvente de la pieza solidificada por disolución sumergiéndola en un segundo disolvente;

10 (v) extraer a temperatura ambiente las partículas de porógeno sumergiendo la pieza en un tercer disolvente que disuelve dichas partículas de porógeno;

(vi) obtener un soporte polimérico con partículas de refuerzo.

15

14 Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la disolución de un polímero presenta una concentración comprendida entre 10% al 40% en peso de polímero con respecto al peso total de la disolución.

20 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el disolvente se selecciona de entre dimetilsulfóxido, cloruro de metileno, acetato de etilo, cloroformo, n-heptano, n-hexano, n-pentano, dioxano, benceno, xileno, acetona, naftaleno y sus mezclas.

25 16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el disolvente es dioxano.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicación 14 o 15, en el que la disolución de polímero se mezcla con las partículas de refuerzo y se homogeneiza con ultrasonidos.

18. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el material de las partículas de porógeno se selecciona de entre el grupo formado por monosacáridos, polisacáridos, sales orgánicas, sales inorgánicas, microesferas acrílicas, microfibras poliméricas y sus mezclas.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en la que las partículas de porógeno se añaden a la disolución de polímero con las partículas de refuerzo en una proporción comprendida entre 40/60 a 70/30 en peso de partículas de porógeno con respecto al peso de la disolución.
20. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el tamaño del diámetro de las partículas de porógeno está comprendido entre 100 y 300 μm .
21. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la mezcla homogénea se congela hasta obtener una pieza solidificada.
22. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que se extrae el primer disolvente de la pieza solidificada por difusión en frío sumergiéndola en un segundo disolvente que se encuentra a una temperatura de -20°C y sin que la temperatura del primer disolvente exceda la de su punto de fusión.
23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que el segundo disolvente se encuentra a una temperatura de -20°C .
24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que el segundo disolvente se selecciona de entre un disolvente orgánico, un inorgánico y sus mezclas.
25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que el

segundo disolvente se selecciona de entre etanol y mezclas de etanol y agua.

26. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que las partículas de porógeno se extraen a temperatura ambiente de la pieza solidificada sumergiendo la pieza en un tercer disolvente capaz de disolver las partículas de porógeno.

27. Procedimiento según la reivindicación 26, en el que el tercer disolvente se selecciona de entre etanol, agua, acetona y sus mezclas.

28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27, que comprende además una etapa de tratamiento superficial del soporte, que forma núcleos inductores de la cristalización de hidroxiapatita biomimética distribuidos por las superficies de los macroporos y de los microporos.

29. Procedimiento según la reivindicación 28, en el que la etapa de tratamiento comprende las siguientes etapas:

1) tratamiento del soporte por exposición a un plasma de un gas o por inmersión en una disolución de hidróxido sódico.

2) inmersión el soporte obtenido en 1) alternativamente en soluciones que contienen cada una iones Ca^{2+} o PO_4^{3-} .

3) inmersión del soporte obtenido en fluido corporal simulado, (SBF).

30. Procedimiento según la reivindicación 29, en el que el fluido corporal simulado presenta la siguiente composición taponada con ácido clorhídrico y e hidrocloreuro de tris

(hidroximetil)aminometano (disolución de Kokubo modificada):

componente	g/L
NaCl	136,8
KCl	3
CaCl ₂ x 6	
H ₂ O	2,5
MgCl ₂ x 6	
H ₂ O	1,5
Na ₂ SO ₄ x 10	
H ₂ O	0,5
NaHCO ₃	4,2
K ₂ HPO ₄ x 3	
H ₂ O	1

31. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 30, que comprende además una etapa de recubrimiento de las superficies internas de los macroporos y microporos, que comprende sumergir un soporte o un soporte bioactivo en un fluido corporal simulado para obtener un soporte híbrido.
32. Soporte obtenible según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 31.
33. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en la generación o regeneración de tejido.
34. Empleo del soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la generación o regeneración de tejido.
35. Empleo según la reivindicación 34, en la que el tejido es conectivo.

36. Empleo según las reivindicaciones 34 o 35 donde el soporte es bioactivo o híbrido.

5 37. Procedimiento para generar o regenerar tejido que comprende:

obtener un soporte bioactivo o un soporte híbrido, y
cultivar in vitro en dicho soporte células de un
tejido,

10 y opcionalmente siembra con células del soporte previo a su cultivo.

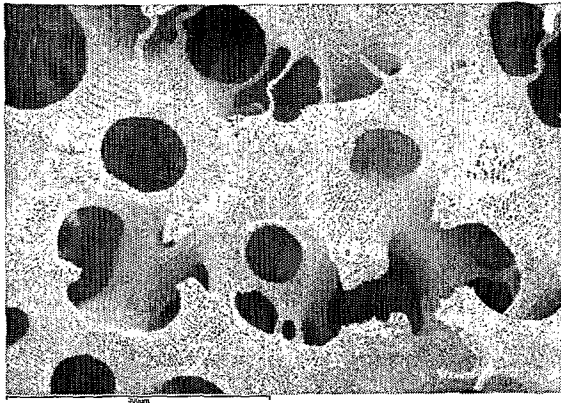


Figura 1 a)

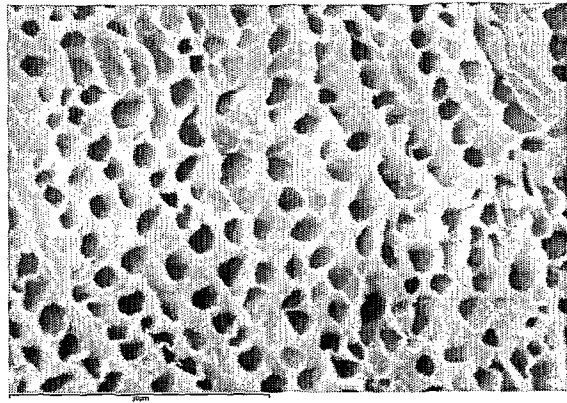


Figura 1 b)

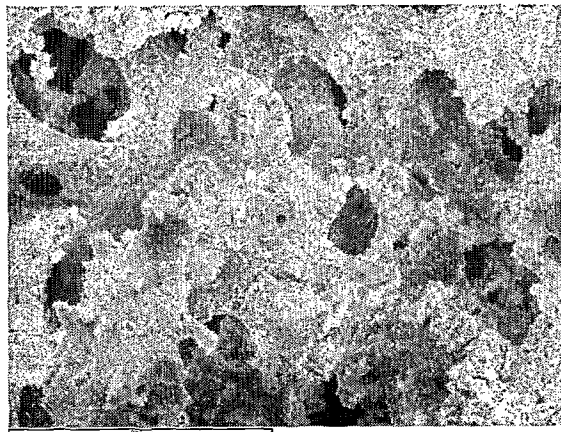


Figura 2 a)

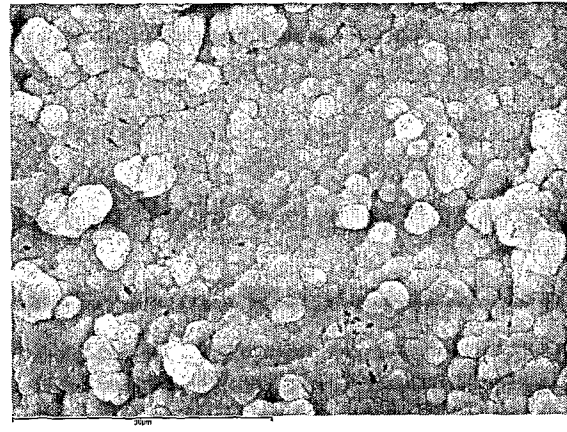


Figura 2 b)

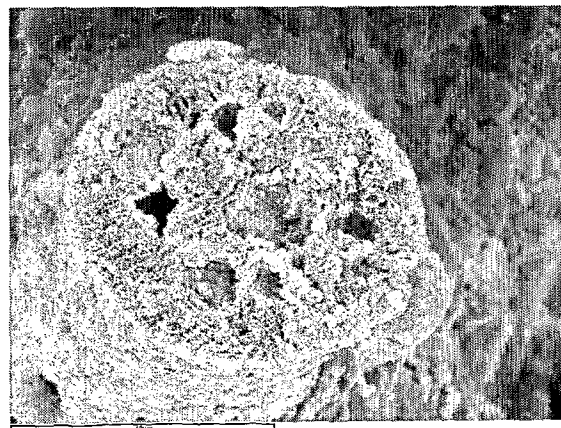


Figura 2 c)



Figura 2 d)

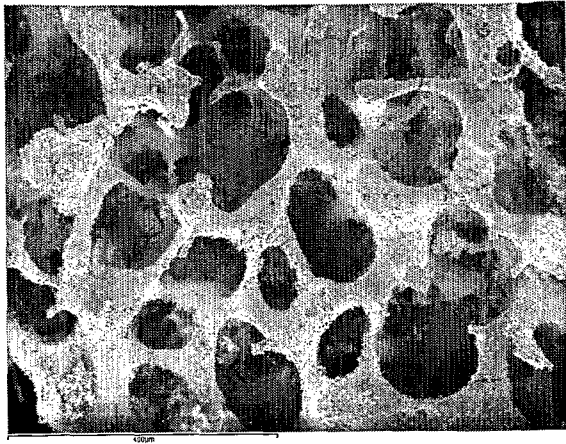


Figura 3

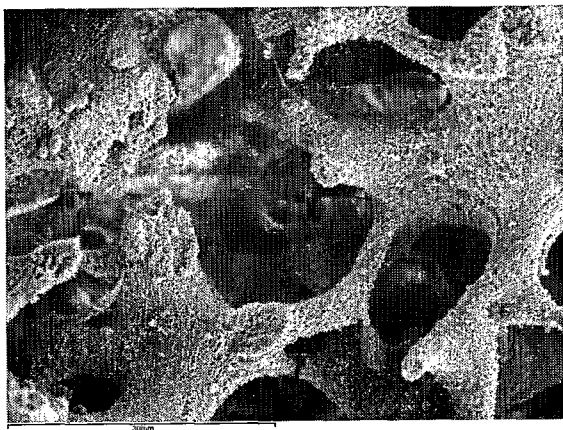


Figura 4

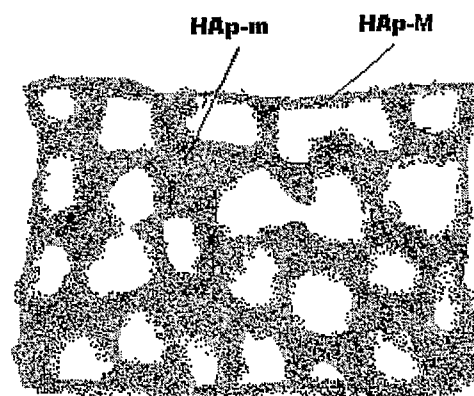
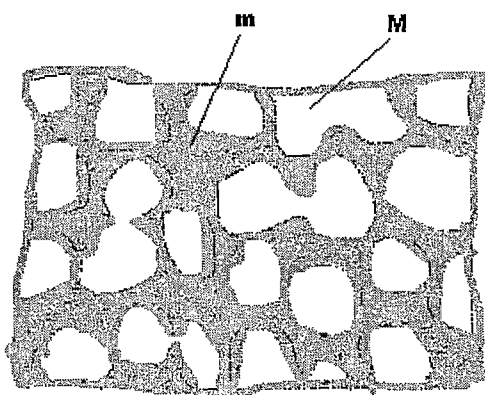


Figura 5: (izq.)

(der.)

Izq: Scaffold sin recubrir con microporos(m) y macroporos(M)

Der: Scaffold recubierto de hidroxiapatita biomimética en

los microporos (HAp-m) y macroporos (HAp-M)

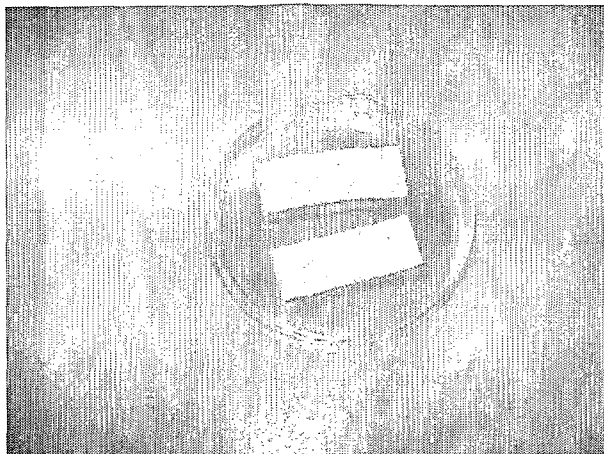


Figura 6

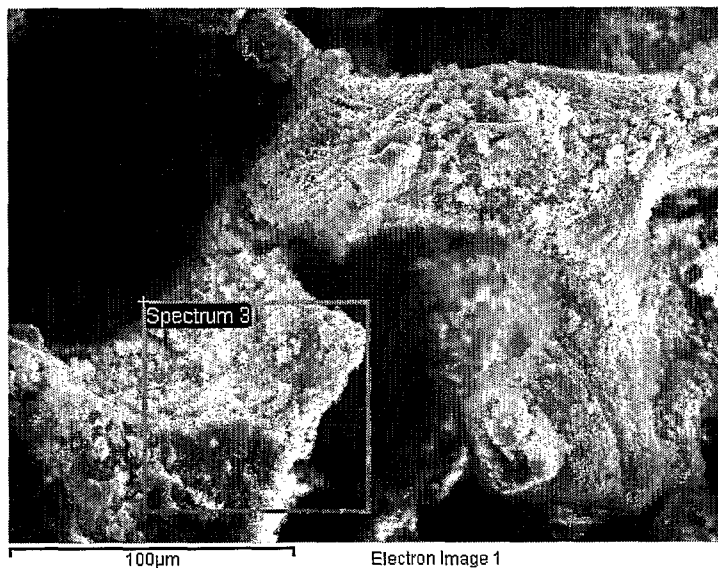


Figura 7

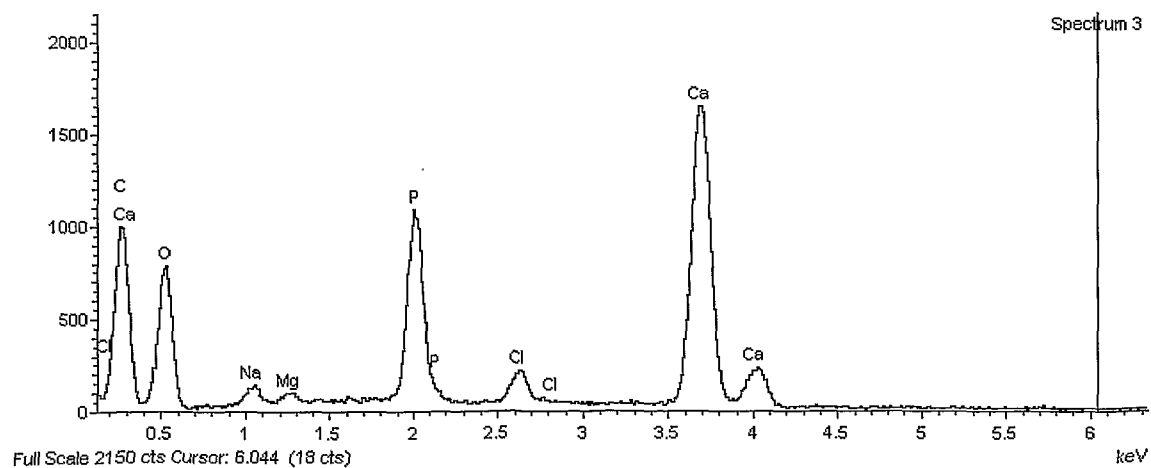


Figura 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003082808 A (GUAN et al.) 01.05.2003; paragraphs [0009]-[0019], [0052]-[0054], [0060]-[0075], [0081]-[0082]; examples 5, 8 and 10; figure 1.	1-6, 8-11, 32-37
X	US 5626861 A (LAURENCIN et al.) 06.05.1997; column 4, lines 8-43; column 5, line 19 - column 11, line 67; examples.	1-6, 8, 32-37
X	CAUSA, F. et al.; Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response; Journal of Biomedical Materials Research, Part A, (2006), 76 (1), pages 151-162; ISSN 1549-3296.	1, 3-8, 32-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 June 2009 (25.06.2009)

Date of mailing of the international search report

(01/07/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

N. Vera Gutiérrez

Telephone No. +34 91 349 55 44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000060

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5338772 A (BAUER et al.) 16.08.1994; column 1, lines 5-9; column 4, lines 3-36; column 4, line 50 - column 5, line 4.	1-6, 8, 32-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000060

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **34-36**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/000060

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003082808 A	01.05.2003	US 6472210 B US 2003008395 A US 6875442 B US 7022522 B	29.10.2002 09.01.2003 05.04.2005 04.04.2006
US 5626861 A	06.05.1997	US 5766618 A	16.06.1998
US 5338772 A	16.08.1994	EP 0519293 AB DE 4120325 A AT 174225 T ES 2127735 T	23.12.1992 24.12.1992 15.12.1998 01.05.1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000060

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 31/12 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES 2009/000060

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 2003082808 A (GUAN et al.) 01.05.2003; párrafos [0009]-[0019], [0052]-[0054], [0060]-[0075], [0081]-[0082]; ejemplos 5, 8 y 10; figura 1.	1-6, 8-11, 32-37
X	US 5626861 A (LAURENCIN et al.) 06.05.1997; columna 4, líneas 8-43; columna 5, línea 19 - columna 11, línea 67; ejemplos.	1-6, 8, 32-37
X	CAUSA, F. et al.; Poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite composites for bone regeneration: in vitro characterization and human osteoblast response; Journal of Biomedical Materials Research, Part A, (2006), 76 (1), páginas 151-162; ISSN 1549-3296.	1, 3-8, 32-37

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T"

documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&"

documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

25 Junio 2009 (25.06.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

01 de Julio de 2009 (01/07/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

N. Vera Gutiérrez

N° de teléfono +34 91 349 55 44

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000060

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 5338772 A (BAUER et al.) 16.08.1994; columna 1, líneas 5-9; columna 4, líneas 3-36; columna 4, línea 50 - columna 5, línea 4.	1-6, 8, 32-37

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000060

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones N°s: 34-36
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
Las reivindicaciones 34-36 se refieren a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.
La búsqueda se ha realizado en base a los posibles efectos de la composición.
2. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000060

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 2003082808 A	01.05.2003	US 6472210 B US 2003008395 A US 6875442 B US 7022522 B	29.10.2002 09.01.2003 05.04.2005 04.04.2006
US 5626861 A	06.05.1997	US 5766618 A	16.06.1998
US 5338772 A	16.08.1994	EP 0519293 AB DE 4120325 A AT 174225 T ES 2127735 T	23.12.1992 24.12.1992 15.12.1998 01.05.1999

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/000060

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 31/12 (2006.01)