

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 691**

21 Número de solicitud: 201730965

51 Int. Cl.:

A61C 13/00 (2006.01)

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

24.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.01.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

25.09.2018

Fecha de concesión:

04.10.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.10.2019

73 Titular/es:

**FUNDACION UNIVERSITARIA SAN ANTONIO
(100.0%)
Campus de los Jerónimos, s/n
30107 Guadalupe (Murcia) ES**

72 Inventor/es:

**MESEGUER OLMO, Luis;
RABADAN ROS, Rubén y
ROS TARRAGA, Patricia**

74 Agente/Representante:

DIAZ PACHECO, Maria De Los Desamparados

54 Título: **Procedimiento de obtención de un material para regeneración ósea y material así obtenido**

57 Resumen:

Nueva formulación para la obtención de materiales porosos (no pulidos) de superficie rugosa biocompatibles y bioactivos para su potencial aplicación como sustitutos de un injerto óseo en aquellas situaciones clínicas en donde se requieran estímulos biológicos para conseguir la regeneración ósea. El material comprende α -sulfato cálcico hemihidratado (α -SCH), β -fosfato tricálcico (β -TCP) y silicato dicálcico (γ -C₂S).

ES 2 697 691 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE UN MATERIAL PARA REGENERACIÓN ÓSEA Y MATERIAL ASÍ OBTENIDO

5

El objeto de la presente invención es una nueva formulación para la obtención de materiales porosos (no pulidos) de superficie rugosa biocompatibles y bioactivos para su potencial aplicación como sustitutos de un injerto óseo en aquellas situaciones clínicas en donde se requieran estímulos biológicos para conseguir la regeneración ósea.

10

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de fabricación de materiales biocompatibles y bioactivos para cirugía reconstructiva ósea en general, en los campos médicos de la traumatología y cirugía ortopédica, cirugía oral, cirugía maxilofacial y neurocirugía.

15

Estado de la técnica anterior

Hasta el día de hoy, el estándar de la sustitución ósea sigue siendo el injerto autólogo de hueso esponjoso. La técnica de uso del autoinjerto consiste en la toma de tejido óseo de otra zona del esqueleto (zona dadora) del mismo paciente, ya sea del mismo hueso o de otro. Los principales inconvenientes de los autoinjertos son los provenientes de la búsqueda y sacrificio de la zona dadora que ocasiona una comorbilidad al paciente de hasta el 25% y disponibilidad limitada cuando se necesitan grandes cantidades de hueso para injertar [1]. Debido a todos estos inconvenientes de los autoinjertos, a lo largo de las últimas décadas, se han estudiado distintas alternativas al uso de estos, como son los «sustitutos óseos» naturales o de síntesis entre los que se incluyen las cerámicas de fosfato cálcico (mono y bifásicas), biovidrios, sulfato cálcico (α -SCH) o yeso de Paris, composites, polímeros, etc. De todas ellos los más utilizados son las biocerámicas y, en concreto, las denominadas de tercera generación, estas son las matrices de moléculas biológicamente activas, que además de ser bioactivas y reabsorbibles, estimulan la regeneración de tejidos vivos mediante una respuesta celular específica. Son los preferidos para ser utilizados como matrices en la ingeniería de tejidos.

Los requisitos de un sustituto óseo ideal son: biocompatibilidad, biodegradabilidad, eficacia mecánica para la aplicación específica, bioconductividad, bioactividad, facilidad para esterilización y almacenaje y relación costo-eficacia razonable. La comparación con el

autoinjerto esponjoso, muestra que, si bien la conductividad de la estructura es común, las capacidades osteogénica y osteoinductora están ausentes. La ingeniería de tejidos intenta, añadiendo células y proteínas de señal dotar a estos materiales de las cualidades estándar de los injertos.

- 5
- Como sustituto del tejido óseo, uno de los primeros materiales investigados fue el yeso de París ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) [α -SCH]. Este se obtiene por proceso de calcinación de la gipsita natural a temperatura de 110-130°C con el que se pierde el 75% del agua. Fue usado por primera vez en 1892, por Dreesman, para rellenar defectos óseos creados por la osteomielitis tuberculosa.
- 10 Su proceso de reabsorción provoca un aumento controlado de la porosidad a la vez que se forma hueso nuevo. Su uso es limitado dada su rápida reabsorción (4-8 semanas) y por su pobre estabilidad estructural que lo hace propenso a las fracturas cuando se inicia la carga de forma precoz.
- 15 La materia prima para su fabricación es barata y abundante. Se ha utilizado tanto para relleno de defectos óseos y como vehículo para liberación controlada de fármacos y factores de crecimiento [2].

- Normalmente a disolución local del yeso provoca aumento en la liberación de iones de calcio [Ca] y acidificación del medio que puede afectar a la función de las células óseas (osteoblastos) y por tanto cierto grado de desmineralización ósea in situ. Aunque en alguna ocasión también ha sido descrito un efecto mitógeno sobre células indiferenciadas. Contrariamente, este hecho puede inhibir la actividad osteoclástica provocando un desequilibrio en el balance formación/resorción ósea que tiene lugar en el proceso de remodelación ósea.
- 20
- 25 Con nuestro material, se observa un proceso inverso, es decir, provoca la alcalinización del medio, lo que contrasta con lo que ocurre con la disolución del yeso aislado.

- Los estudios referidos a aplicaciones preclínicas y clínicas han estado enfocadas a ensayos en animales en el campo de la odontología para tratar defectos periodontales. Para este fin, se
- 30 han ensayado diversas composiciones:

- Hueso alogénico desmineralizado y liofilizado + (α -SCH) [3]
- Matriz ósea desmineralizada (DBM) + (α -SCH) [4,5]
- Hueso autólogo + (α -SCH) [6]
- 35 - Chitosa + (α -SCH) + BMP [7]

- Fosfato-Ca silicado + (α -SCH) [8]
- Hidroxiapatita + (α -SCH) [9]
- PRP + (α -SCH) [10]
- Cementos acrílicos (PMMA) + (α -SCH) [11]
- 5 - Antineoplásicos (metrotexate) + (α -SCH) [12].
- Aloinjertos + (α -SCH) [13,14]
- Biovidrio + (α -SCH) [15]
- Carboximetil celulosa + (α -SCH) [16]
- Ac Hialurónico + (α -SCH) [17]
- 10 - Ac Poliláctico + (α -SCH) [5]
- Ac. Poliacrílico + (α -SCH) [18]

Lamentablemente, los resultados observados con el uso de los diferentes materiales o composiciones descritas no son comparables por la heterogeneidad de los diseños de los estudios realizados (tipo de animal, duración estudio, estirpes celulares usadas, lugar implantación, etc.).

La asociación del α -SCH con otros compuestos inorgánicos en un esfuerzo por mejorar su manejo/manipulación y sus propiedades físicas, no han dado todos los resultados óptimos esperados [19], si bien es cierto en algunas situaciones mejoro su bioactividad. Esta bioactividad expresada como combinación reabsorción/deposición de una neocapa granular en la superficie del material y de composición próxima a la hidroxiapatita es similar la observada con los biovidrios.

La adición de TCP para tratar defectos óseos críticos en perros hizo mejorar la reparación del defecto comparándolo con el control no rellenado [20].

El yeso posee muchas de las cualidades deseadas de un material regenerador ideal, como es: (a) completa reabsorción a un corto periodo de tiempo (1 mm por semana), (b) excelente biocompatibilidad, (c) aporte abundante de iones de Ca, (d) relativamente barato, fácil de manipulación y de moldear antes de fraguar, (e) excelentes propiedades como transportador para diferentes tipos de moléculas (antibióticos diversos, factores crecimiento, antineoplásicos, etc.). Aunque también muestra algunas desventajas: rápida reabsorción y el contacto con fluidos biológicos enlentece el fraguado lo que podría cuestionar su permanencia en el lugar de implantación.

Aunque una parte de los ensayos referencian la utilidad del yeso en la regeneración ósea, hay algunos informes negativos en estudios en animales [15]. Pero un problema que hace difícil las comparaciones radica en la naturaleza heterogénea de los estudios con yeso. A pesar de ello, el α -SCH hoy día se utiliza para relleno de cavidades óseas en cirugía reconstructiva tanto oral como en otras disciplinas quirúrgicas (ortopedia y traumatología, cirugía maxilofacial, etc.) [21] [22].

Otro aspecto de interés es la alta temperatura que alcanzan determinadas formulaciones como es el caso de los cementos de polimetilmetacrilato (PMMA) durante el proceso de polimerización (fraguado) a los pocos minutos de realizar la mezcla. Este material conserva la misma temperatura igual a la temperatura ambiente (22°C) durante todo el proceso de fraguado, razón por la que descartamos el efecto negativo que las reacciones exotérmicas tienen sobre la adhesión y viabilidad celular y en definitiva sobre los tejidos adyacentes.

En estudios preclínicos *in vivo* que se están llevando a cabo en modelo animal (conejo NZ), se evalúan los efectos del nuevo material en cuanto a su potencial capacidad osteogénica, osteoinductora, osteointegración, grado de reabsorción, etc. En el presente documento se ha evaluado la citotoxicidad, viabilidad o proliferación celular, adsorción de proteínas, bioactividad, liberación iónica, tiempo de fraguado y temperatura registrada o desprendida durante el fraguado del material objeto de la presente invención.

Bibliografía

- [1] Gazdag A, Lane J, Glaser D, Forters R. J Am Acad Orthop Surg. 1995;3:1-8.
- [2] Thomas MV, Pileo D. J Biomed Mater Res Part B: appl Biomater 2009, 88B:597-610.
- [3] Kim CK, Kim HY, Chai JK, et al. J Periodontol 1998, 69:982-988.
- [4] Kim CK, Chai JK, Cho KS, et al. J Periodontol 1998, 69:1317-1324.
- [5] Rosen PS, Reinols MA. J. Periodontol 1999, 70:554-561.
- [6] Macneill SR, Cobb CM, Rapley JW, et al. J Clin Periodontol 1999, 26:239-245.
- [7] Cui X, Zhang B, Wang Y, Gao Y. J Craniofac Surg 2008, 19:459-465.
- [8] Hing KA, Wilson LF, Buckland T. Spine 2007, 7:475-490.
- [9] Frenkel SR, Simon J, Alexander H, et al. J Biomed Mater Res 2002, 63:706-713.
- [10] Intini GE. Tissue Eng 2002, 104:384-386.
- [11] Tuzuner T, Uygur I, Sencan I, et al. J Orthop Sci 2007, 12:170-177.
- [12] Vechasilp j. J Orthop Res 2007, 15:56-61.

- [13] Wright HB. University of Kentucky College of Dentistry, 2004, 62p.
 [14] Sottonanti Calciun sulphate. Compedium 1992, 13:226-228
 [15] Melo LG, Nagata MJ, Bosco AF, et al. Clin Oral Implants Res 2005, 16:683-691.
 [16] Vance GS, Greewell H, Miller RL et al. J Oral Maxillofac Implants 2004, 19:491-497.
 5 [17] Lewis KN, Thomas MV, Puleo DA, et al. J Mater Sci Mater Med 2006, 17:531-537.
 [18] Neira-Carrillo, Yazdani-Pedram M, Retuert J, et al. J Colloid Interface Sci 2005;286:134-141.
 [19] Huan Z, Chang J. Acta Biomater 2007, 3:952-960.
 [20] Urban RM, Turner TM, Hall DJ, et al. Clin Orthop Relat Res 2007, 459:110-117.
 10 [21] Kelly CM, Wilkins RM. Orthopaedics 2004, 27:131-135
 [22] Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, Harjten C, et al. Clin Orthop Relat Res 2001, 42-50

Explicación de la invención

- 15 La presente invención está referida a la obtención de piezas compuestas de α -SCH + β -TCP + γ -C₂S que actúen como un andamio para promover y dirigir el crecimiento óseo en el lugar de su implantación, facilitando el proceso de regeneración de los tejidos óseos y, como consecuencia, la reparación de los defectos óseos. De igual modo, se pretende mejorar determinadas propiedades como: bioactividad, tiempo de fraguado, adhesión celular y
 20 manipulación, comparándolo con el α -SCH que ha sido utilizado, en la presente invención, como material de control por el hecho de ser un material reabsorbible ampliamente utilizado durante décadas, tanto de modo experimental, como en la práctica clínica.

- La invención consiste en la obtención de un material de las características descritas como
 25 resultado de la mezcla de tres componentes α -sulfato cálcico hemihidratado (α -SCH) [CaSO₄-1/2 H₂O], β -fosfato tricálcico (β -TCP) [Ca₃(PO₄)₂] y silicato dicálcico (γ -C₂S) [2CaO.SiO₂] en una proporción determinada. Para los ensayos *in vitro* se han obtenido piezas compactas de 7,5 mm de diámetro y $2,65 \pm 0,2$ mm de altura.

- 30 En los ensayos preclínicos *in vitro*, el material ha mostrado ser biocompatible, no observándose signos de citotoxicidad, de igual modo, capaz de absorber proteínas en su superficie y algo en su interior, y ser altamente bioactivo, como se observa a las 24 horas de inmersión en suero humano simulado (simulated body fluid)(SBF). Estos hechos facilitan la adhesión celular sobre la superficie del material al reconocer las integrinas de la pared celular la secuencia glicina,
 35 arginina y aspártico (GRD) de las proteínas adheridas. La reacción de las dos fases

líquido/polvo correspondiente a los tres componentes no provoca reacción exotérmica que pudiera ocasionar daños celulares o alteración de la capa proteica. Finalmente, el tiempo de fraguado o solidificación no es superior al observado con el α -SCH. Por todo ello, consideramos que este nuevo compuesto trifásico y bioactivo, puede considerarse un material adecuado para su aplicación en el relleno de defectos óseos de cualquier etiología, en aquellos campos de la cirugía reconstructiva ósea, tal como cirugía ortopédica y traumatología, cirugía oral y maxilofacial y neurocirugía.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra «comprende» y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que restrinjan la presente invención. Además, la presente invención esta cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, se pasa a describir de manera muy breve una serie de dibujos que ayudan a comprender mejor la invención y que se relacionan expresamente con una realización de dicha invención que se presenta como un ejemplo no limitativo de ésta.

FIG.1 muestra el aspecto ultraestructural de los componentes de la mezcla del biomaterial objeto de la invención, así como sus respectivos análisis mediante difracción de rayos X (EDX).

FIG.2 muestra de modo esquemático los pasos seguidos para obtener la mezcla adecuada, y previos a agregar fase líquida (A) para obtener un material de características y consistencia similar a la “*pasta de dientes*”. Aspecto de las piezas fraguando en su molde (B) y finalmente, las piezas del material en forma de disco obtenidas (C).

FIG.3 muestra de forma esquemática el tiempo de fraguado y comportamiento térmico de la mezcla del material objeto de la invención, incluyendo: la marca perceptible sobre la superficie del material (Fig. 3-A); Fig. 3-B. Imágenes comparativas de las marcas

provocadas por la aguja sobre la superficie de los especímenes, α -SCH en contacto con suero bovino (fila superior), α -SCH (fila central) y material de la invención (fila inferior); Fig. 3-C. Variaciones de temperatura registradas durante el proceso de fraguado a temperatura ambiente

5

FIG.4 muestra la determinación de la adsorción de proteínas en la superficie del material mediante el test colorimétrico de Coomassie. (a) Coloración azul del material impregnado de proteínas en su superficie (test Coomassie +); (b) Datos de cuantificación de las proteínas absorbidas.

10

FIG.5 muestra gráficamente los resultados del análisis de liberación iónica (Ca, P, S, Si) y pH del material objeto de la invención sumergido en medio de cultivo completo (DMEM) mediante espectrometría ICP-OES (*Inductively coupled plasma-optical emission spectrometer*).

15

FIG.6 muestra diversos aspectos de la caracterización del material llevado a cabo mediante: (FIG.6A) aspecto ultra estructural del material mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a diferentes aumentos y tabla con resultados del microanálisis; (FIG.6B) difracción de rayos X (EDX); y (FIG.6C) infrarrojo por transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada (FTIR).

20

FIG.7 En el ensayo de bioactividad realizado, muestra mediante SEM el aspecto de la superficie del material, (a) Límite de la capa de apatita neoformada sobre la superficie del material (flecha), (b) Espesor de la capa en una sección perpendicular a la superficie, (c) núcleos de cristalización depositados, (d) detalle de la imagen anterior a mayor aumento (barra 3 μ m).

25

FIG.8: (a) los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad comparados con yeso de Paris mediante SEM y (b) test de proliferación celular sobre el material mediante la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) a 1, 3, 5, 7 días.

30

Exposición de un modo detallado de realización de la invención y ejemplo

La presente invención está referida a un procedimiento para la obtención de un material trifásico biocompatible y bioactivo obtenido por la mezcla de α -SCH (componente principal) + β -

35

TCP + γ -C₂S en la proporción o ratios 4:1:1 (66.6, 16.6 y 16.6 w%, respectivamente) para su potencial uso en la regeneración del tejido óseo.

Una vez realizada la mezcla de la fase sólida (polvos) se le añadió agua desionizada en la proporción establecida líquido/Polvo de 0.33 ml g⁻¹. A continuación, el material adquiere un aspecto pastoso similar a la “*pasta de dientes*” de densidad media, y es cuando se vierte sobre el molde y se dejó fraguar-secar en estufa a 37°C durante 24 horas. Finalmente, las muestras fueron retiradas de los moldes y guardadas en un contenedor sellado en ambiente seco en estufa. El nuevo material obtenido muestra una forma discoidea de 7.5 mm de diámetro y 2.65 ± 0.2 mm de altura y de peso medio 216 ± 5 mg, de aspecto compacto que evita las complicaciones técnicas ocasionadas por dispersión del material durante su posterior manipulación cuando se llevan a cabo los estudios in vitro y en los ensayos in vivo (implantación intraósea). Por las características del material, y su comportamiento in vitro, se prevé que este sea potencialmente reabsorbible a medio plazo (4-6 meses), por lo que no precisaría su posterior retirada del lugar en donde ha sido implantado.

La figura 1 muestra aspecto ultra estructural de los componentes de la mezcla (β -fosfato tricálcico (β -TCP) [Ca₃(PO₄)₂], silicato dicálcico (γ -C₂S) [2CaO.SiO₂], y α -SCH), así como sus respectivos microanálisis mediante EDX. La figura 2, por otro lado, muestra de modo esquemático los pasos seguidos para obtener la mezcla adecuada, y previos a agregar fase líquida (A) para obtener un material de características y consistencia similar a la “*pasta de dientes*”. Aspecto de las piezas fraguando en su molde (B) y finalmente, las piezas del material en forma de disco obtenidas (C).

La Figura 3 hace referencia al tiempo de fraguado y comportamiento térmico. Se utilizó una técnica modificada de Gillmore [Kokubo T, Shigematsu M, Nagashima Y, Tashiro M, Nakamura T, Yamamuro T, et al. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.*, 60, 260, 1982] para obtener datos cualitativos. La punta del indentador tiene 1 mm de diámetro y concentra una carga de 50 gramos. Definiendo como tiempo de fraguado, el tiempo transcurrido desde que se realiza la mezcla Líquido/Polvo y la pasta obtenida se deposita en los moldes, hasta que la aguja no deja una indentación o marca perceptible sobre la superficie del material. (Fig. 3-A) El ensayo se ha realizado sobre 5 muestras (n=5) de cada material. Los resultados han permitido afirmar que el tiempo de fraguado del material objeto de la invención fue de doce minutos, similar al del α -SCH. Este tiempo se incrementó notablemente cuando se sustituyó el agua desionizada por suero bobino fetal para simular un ambiente biológico en contacto con fluidos orgánicos (Fig. 3-

B, fila superior).

Para determinar las posibles variaciones de temperatura durante el proceso de fraguado se utilizó un termómetro infrarrojo Flash III-Ther-L02. La toma de datos se hizo coincidir en el tiempo con las realizadas para determinar en grado de fraguado del material (Fig. 3-C).

La Figura 4 muestra la determinación de la adsorción de proteínas en la superficie del material mediante el test colorimétrico de Coomassie. (a) Nivel de penetración de la tinción equivalente a la absorción de proteína. (b) Ensayo cuantitativo mediante analizador elemental de nitrógeno LECO FP-528 y expresado mediante diagrama de barras. Ensayos realizados a 1h y 24 horas de inmersión del material en suero bovino fetal y mantenidos en incubadora a 37°C durante ese periodo.

La Figura 5 representa gráficamente los resultados del análisis de liberación iónica (Ca, P, S, Si) y pH del material objeto de la invención sumergido en medio de cultivo completo (DMEM) mediante espectrometría ICP-OES (*Inductively coupled plasma-optical emission spectrometer*). Determinaciones realizadas a 1, 3, 6 horas y 1, 2, 3, 4 y 7 días. Los cambios más relevantes, mayor liberación de iones, se observan a la 24h de inmersión que ocasionan una ligera alcalinización del medio de cultivo (pH 8.16-8.2).

Los valores de pH fueron medidos usando un electrodo de un pH metro digital. Antes de realizar cualquier medida el pH metro fue calibrado con solución de pH estándar. Las muestras fueron colocadas en tubos de Falcon 15 ml conteniendo 10 ml de tampón PBS. Las mediciones de pH de estas soluciones se realizaron a temperatura ambiente a 1 y 24 horas de inmersión.

La Tabla I, recoge los datos referentes al proceso de dilución del material objeto de la invención comparándolo con el material α -SCH. El ensayo se llevó a cabo sobre seis discos (n=6) de cada material. Estos fueron pesados individualmente antes de depositarlos en sus respectivos pocillos de una placa de 24 pocillos y mantenidos en su posición mediante rejilla. Se sumergieron en agua desionizada MilliQ y en agitación magnética de forma continuada durante 24 horas. Seguidamente, se retiró el sobrenadante, se secaron en estufa a 60°C y, finalmente, se volvieron a pesar de forma individual.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla inferior como la media de los datos registrados expresados en gramos.

Tabla I

Material	Pre-lavado(g)	Post-lavado(g)	Pérdida media (g)	Máx./Min (g)	% pérdida
α -SCH	0,220	0,167	0,057	0,069/0,050	25,91%
Invencción	0,216	0,115	0,066	0,093/0,045	30,67%

El análisis de estos datos revela que, aunque se parte de igual peso en la fase de polvo, y usando algún tipo de molde en la fase de pasta después de añadir agua, los pesos después de secado, por término medio, son inferiores en el material de la invención. Además, en ocasiones, no existe relación directa entre la pieza que más pesa con la cantidad de material perdido o diluido, es decir, que a mayor peso no hay mayor tasa de dilución. Finalmente, el material objeto de la invención presenta una pérdida del 4,76% superior al α -SCH (0,009 g).

La figura 6 muestra diversos aspectos de la caracterización del material llevado a cabo mediante: (FIG.6A) aspecto ultra estructural del material mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a diferentes aumentos y tabla con resultados del microanálisis; (FIG.6B) difracción de rayos X (EDX); y (FIG.6C) infrarrojo por transformada de Fourier-Reflectancia Total Atenuada (FTIR).

En la FIG.6B se observa el patrón de difracción por rayos X del α -SCH y de la invención. El material objeto de la invención presenta, mayoritariamente, picos correspondientes con yeso deshidratado y yeso hemihidratado (fichas ASTM nº33-0311 y 41-0224 respectivamente). El resto de fases se encuentran, principalmente, solapadas con el yeso, aunque se puede apreciar la presencia de las fases β -TCP y γ -C₂S (Fichas ASTM nº 55-0898 y 87-1257 respectivamente) en los picos que surgen a 27,8 2 θ y 32,5 – 32,6 2 θ , y en el aumento de intensidad del pico situado a 29,7 2 θ , efecto producido por la presencia de γ -C₂S.

La FIG.6C muestra los diferentes espectros de los materiales β -TCP, γ -C₂S, yeso y el material de la invención obtenidos mediante un equipo IRTF-ATR (Infrarrojo por Transformada de Fourier – Reflectancia Total Atenuada). Como podemos observar, en el espectro obtenido del material de la invención se puede ver la presencia tanto del yeso como del β -TCP y del γ -C₂S. El yeso es el componente mayoritario, como cabría esperar, y el β -TCP y el γ -C₂S aparecen en el intervalo de 1200 a 800 cm⁻¹.

La capacidad de formación de una capa de apatita sobre la superficie del material cuando éste entra en contacto con el SBF es un procedimiento in vitro utilizado siempre para determinar la

bioactividad de un biomaterial con vistas a su aplicación en la reparación ósea. Este ensayo se realizó sumergiendo el material durante 24 horas con SBF siguiendo el protocolo de Kokubo et al. [Kokubo T, Shigematsu M, Nagashima Y, Tashiro M, Nakamura T, Yamamuro T, et al. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.*, 60, 260, 1982]. La FIG.7 muestra el aspecto de la superficie del material, (a) Límite de la capa de apatita neoformada sobre la superficie del material (flecha), (b) Espesor de la capa en una sección perpendicular a la superficie, (c) núcleos de cristalización depositados y (d) detalle de la imagen anterior a mayor aumento (Magnificación barra 3 μm).

La Figura 8 se representa los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad comparados con yeso de Paris mediante microscopia electrónica de barrido y test de proliferación celular mediante la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) a 1, 3, 5, 7 días. Se utilizaron células indiferenciadas multipotentes de la medula ósea crioconservadas que fueron donadas por la unidad de terapia celular del Hospital U. V. Arrixaca. El ensayo se llevó a cabo siguiendo la normativa ISO-10993-5, mediante test directos e indirectos utilizando insertos y placas de 24 pocillos que permitieron mantener el material sin contacto con las células madre adultas cultivadas en los pocillos a una densidad de 5×10^3 células cm^{-2} . La incubación se llevó a cabo en condiciones estándar de temperatura, CO_2 y humedad relativa. (A) Imágenes representativas de la adhesión de las células madre mesenquimales adultas (MSCs-A) sobre la superficie del material a las 24h de incubación. (B) Morfología poligonal con extensas prolongaciones citoplasmáticas (filopodia) de las células a los 7 días en cultivo. (Barra 100 μm). (C) Resultados del ensayo de proliferación celular (MTT) comparándolo con el crecimiento sobre yeso a 1, 3 y 7 días en cultivo.

Por tanto, tal y como ha quedado indicado, los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo indican que el material desarrollado exhibe gran potencial para su aplicación en la reconstrucción ósea, sin esperar una respuesta inmunitaria adversa que conlleve a un daño celular. El material objeto de la invención muestra un grado de bioactividad muy superior al α -SCH como se puede observar después de permanecer 24 horas en contacto con el SBF. La liberación iónica por parte del material de la invención es máxima a las 24 horas y no provoca cambios relevantes, salvo ligera alcalinización en el pH del medio.

El tiempo fraguado ha resultado ser igual para ambos materiales. Un tiempo prolongado de fraguado puede ocasionar una dificultad para mantener su estructura en el momento de su implantación en el defecto óseo a reparar, dando lugar indirectamente a una pérdida de

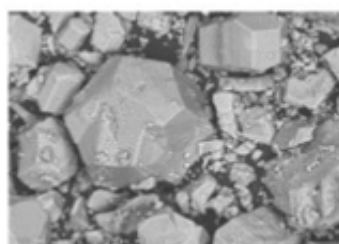
resistencia mecánica, al menos inicialmente. No se ha detectado cambios de temperatura durante el proceso de fraguado, conservando o disminuyendo ligeramente con respecto a la temperatura ambiente. El hecho de que no se desencadene una reacción exotérmica lo consideramos favorecedor tanto para la adhesión de proteínas como para la adhesión celular.

- 5 La presencia o contacto de los materiales con fluidos biológicos como el suero bobino fetal (Fetal calf serum) (FCS) en sustitución del agua desionizada enlentece considerablemente el tiempo de fraguado.

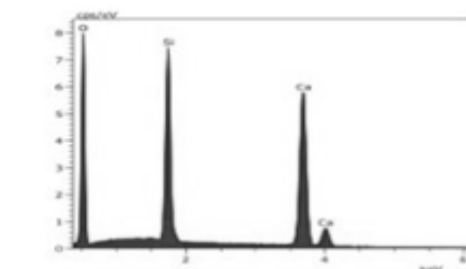
- 10 Este material fue diseñado, desarrollado y testado con intención de incrementar el grado de bioactividad y proliferación celular, sin variar el tiempo de fraguado, manteniendo las propiedades de histocompatibilidad, comparándolo con el α -SCH.

REIVINDICACIONES

1. Un material para regeneración ósea que se **caracteriza** por que comprende α -sulfato cálcico hemihidratado (α -SCH), β -fosfato tricálcico (β -TCP) y silicato dicálcico (γ -C₂S) en una
5 proporción o ratio de la mezcla de α -SCH, β -TCP y γ -C₂S de 4:1:1.
2. Un método de obtención de un material de regeneración ósea de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de:
 - a. Mezclar en fase sólida α -SCH, β -TCP y γ -C₂S;
 - 10 b. Añadir agua desionizada;
 - c. Verter sobre un molde y fraguar-secar en estufa a 37°C durante 24 horas.donde la mezcla en fase sólida de α -SCH, β -TCP y γ -C₂S se realiza en una proporción de 4:1:1.
- 15 3. Uso del material definido en la reivindicación 1 u obtenido según el método de la reivindicación 2 en la elaboración de un preparado para la regeneración del tejido óseo.
4. Uso del material definido en la reivindicación 1 u obtenido según el método de la reivindicación 2 en la elaboración de un preparado para cirugía reconstructiva ósea.
20
5. Uso del material definido en la reivindicación 1 u obtenido según el método de la reivindicación 2 en la elaboración de un preparado como sustituto de injertos óseos.

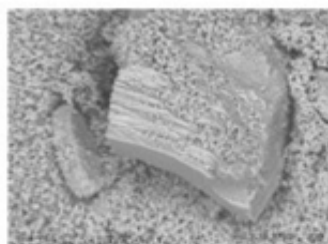


C2S / Mag:1771x / HV:10.0kV

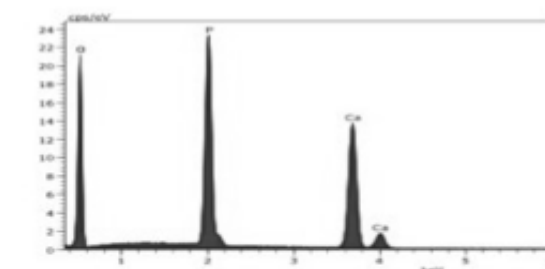


(C2S).1.spx Date:11/13/2015 12:35:02 PM HV:10.0kV Puls th.:3.1

El	AN	Series	unn.	C norm.	C Atom.	C Error (1 Sigma)
			[wt. %]	[wt. %]	[at. %]	[wt. %]
C	6	K-series	1.34	1.31	2.58	0.29
O	8	K-series	40.43	39.54	58.28	4.85
Si	14	K-series	17.62	17.23	14.47	0.75
Ca	20	K-series	42.88	41.92	24.67	1.46
Total:			102.28	100.00	100.00	

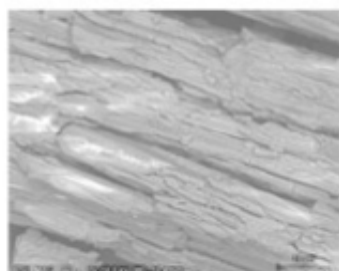


TCP / Mag:855x / HV:15.0kV

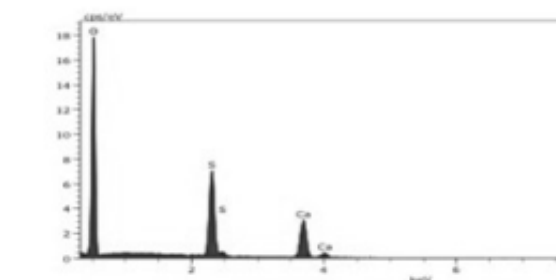


(TCP).1.spx Date:11/13/2015 11:48:27 AM HV:15.0kV Puls th.:1

El	AN	Series	unn.	C norm.	C Atom.	C Error (1 Sigma)
			[wt. %]	[wt. %]	[at. %]	[wt. %]
C	6	K-series	1.90	1.72	3.02	0.38
O	8	K-series	59.99	54.20	71.36	6.74
P	15	K-series	17.55	15.86	10.78	0.69
Ca	20	K-series	31.24	28.23	14.84	0.96
Total:			110.69	100.00	100.00	



SCH / Mag:1300x / HV:10.0kV



(yeso).1.spx Date:11/13/2015 12:41:12 PM HV:10.0kV Puls th.:3.66

El	AN	Series	unn.	C norm.	C Atom.	C Error (1 Sigma)
			[wt. %]	[wt. %]	[at. %]	[wt. %]
C	6	K-series	2.11	2.00	3.37	0.48
O	8	K-series	62.20	58.86	74.58	7.32
S	16	K-series	18.82	17.81	11.26	0.71
Ca	20	K-series	22.56	21.34	10.80	0.80
Total:			105.69	100.00	100.00	

FIG.1

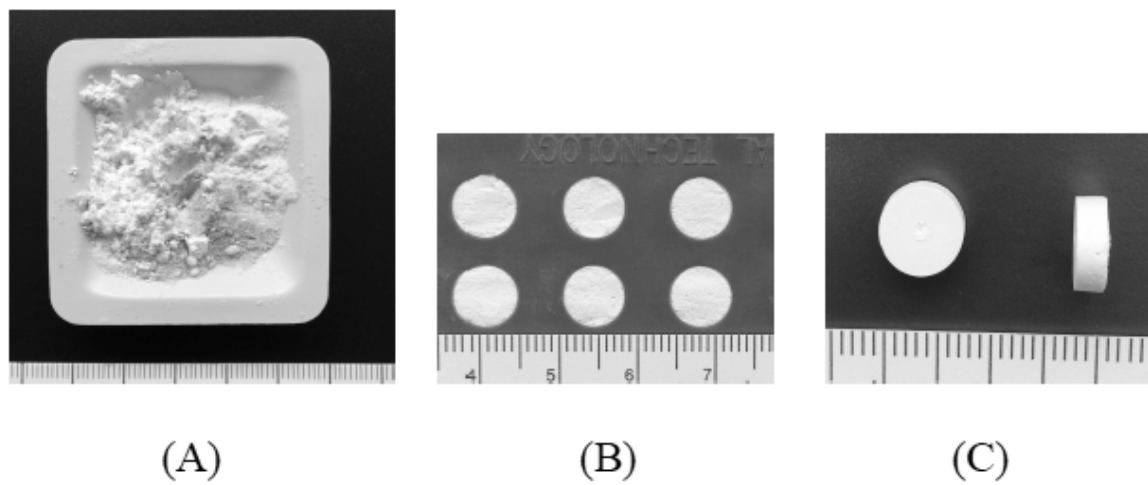


FIG. 2

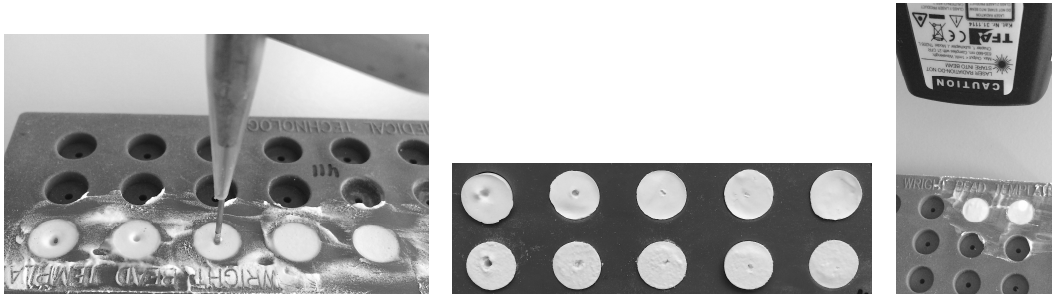


Fig. 3-A

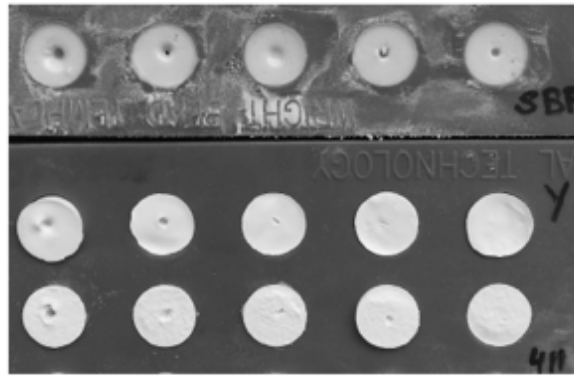


FIG.3-B

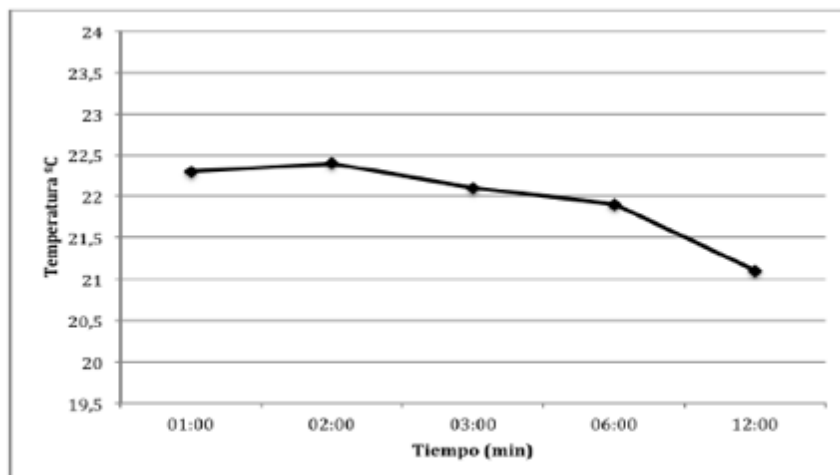


FIG. 3-C



Fig. 4-A

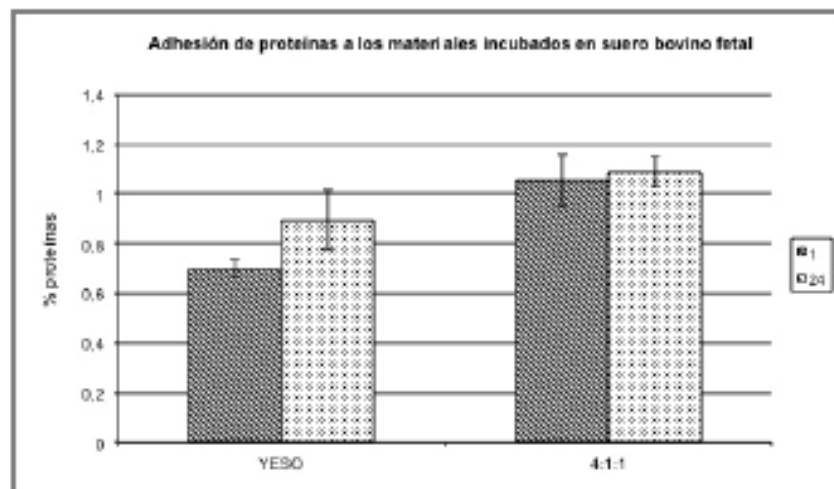


Fig. 4-B

FIG. 4

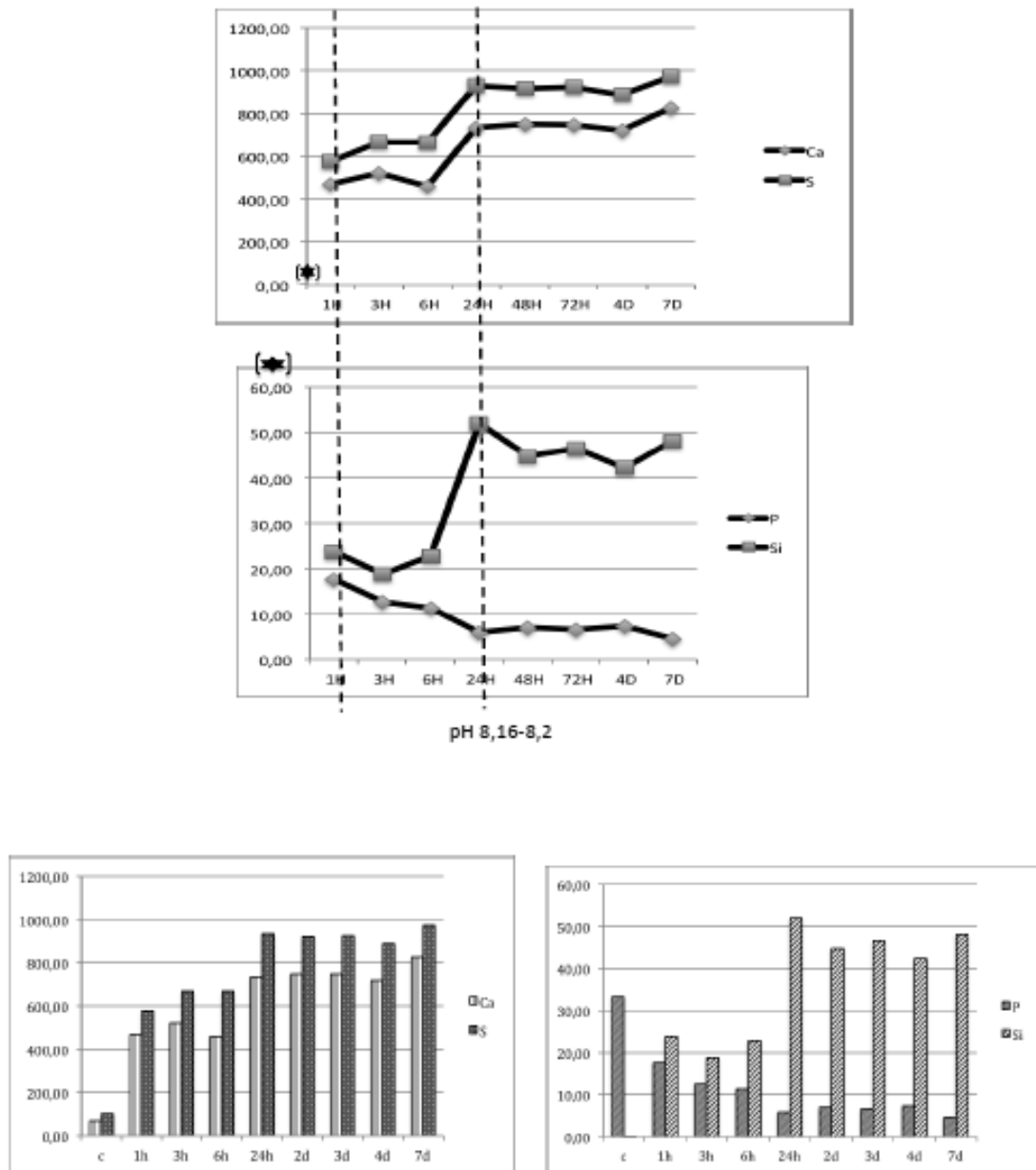
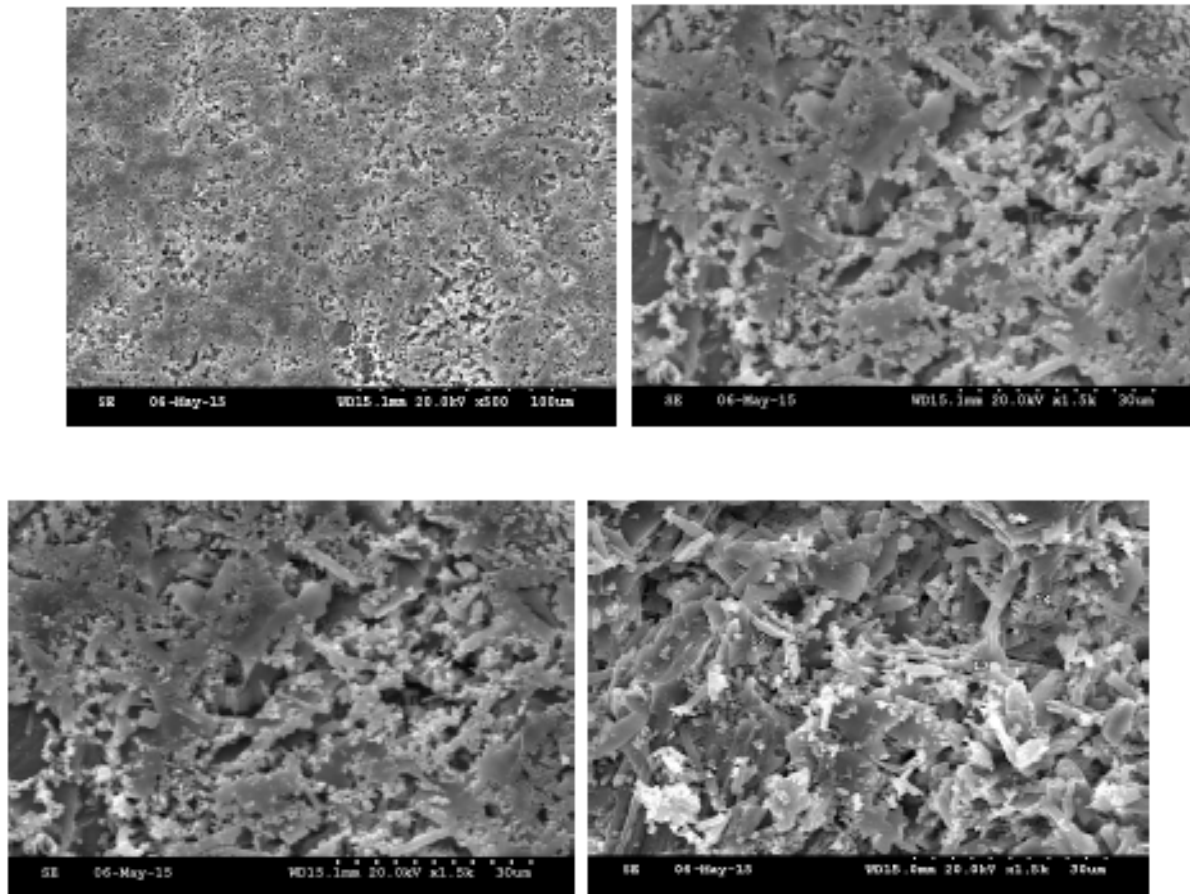


FIG. 5



Element	App Conc.	Intensity	W %	W% sigma	Atomic%
Si K	6.11	0.98	8.92	0.29	11.63
P K	10.41	1.31	11.44	0.37	13.52
S K	5.85	0.90	9.36	0.33	10.69
Ca K	49.74	1.02	70.28	0.49	64.17
Totals					100.0

Fig. 6-A

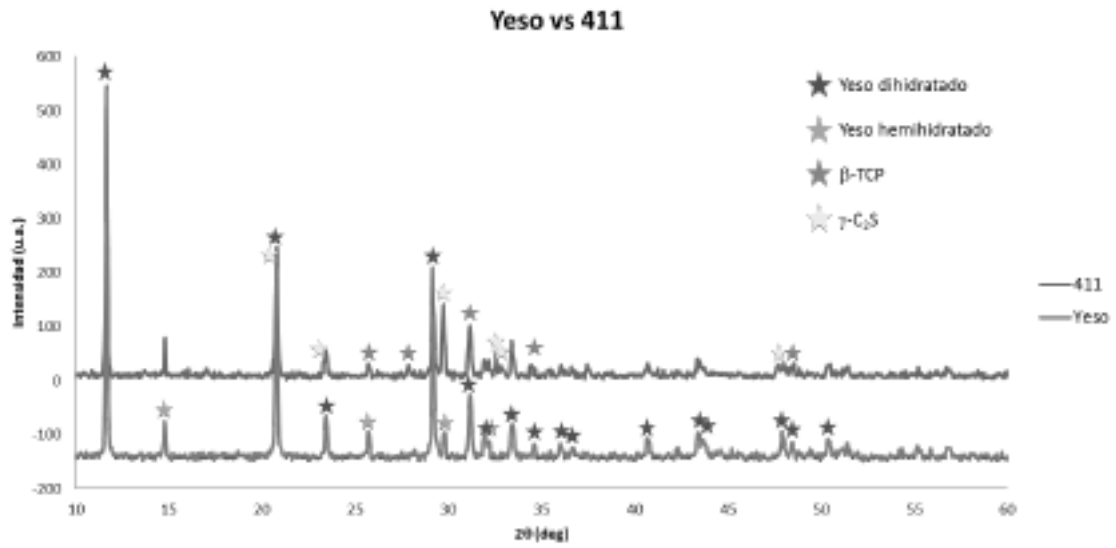
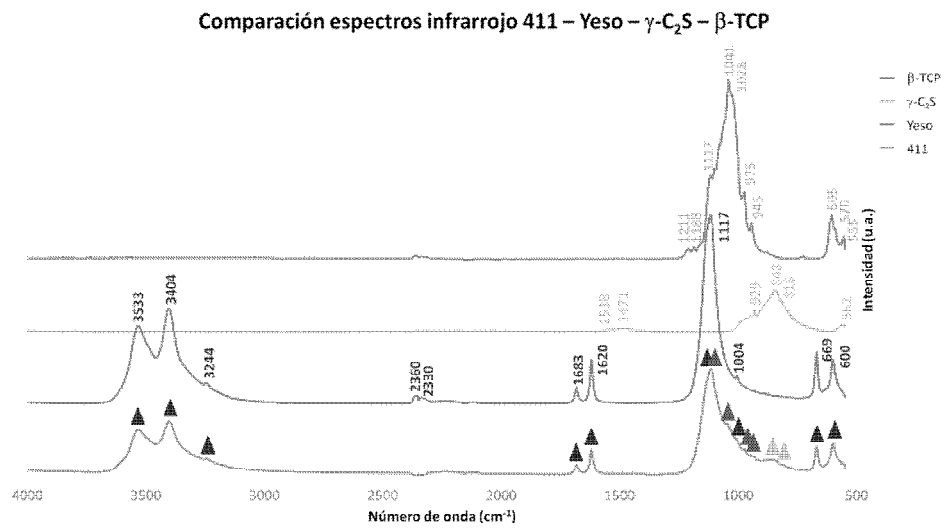


FIG. 6-B



Espectro IRTF de los materiales 411, Yeso, γ -C₂S y β -TCP. ▲ = gypsum; ▲ = β -TCP; ▲ = γ -C₂S.

Fig. 6-C

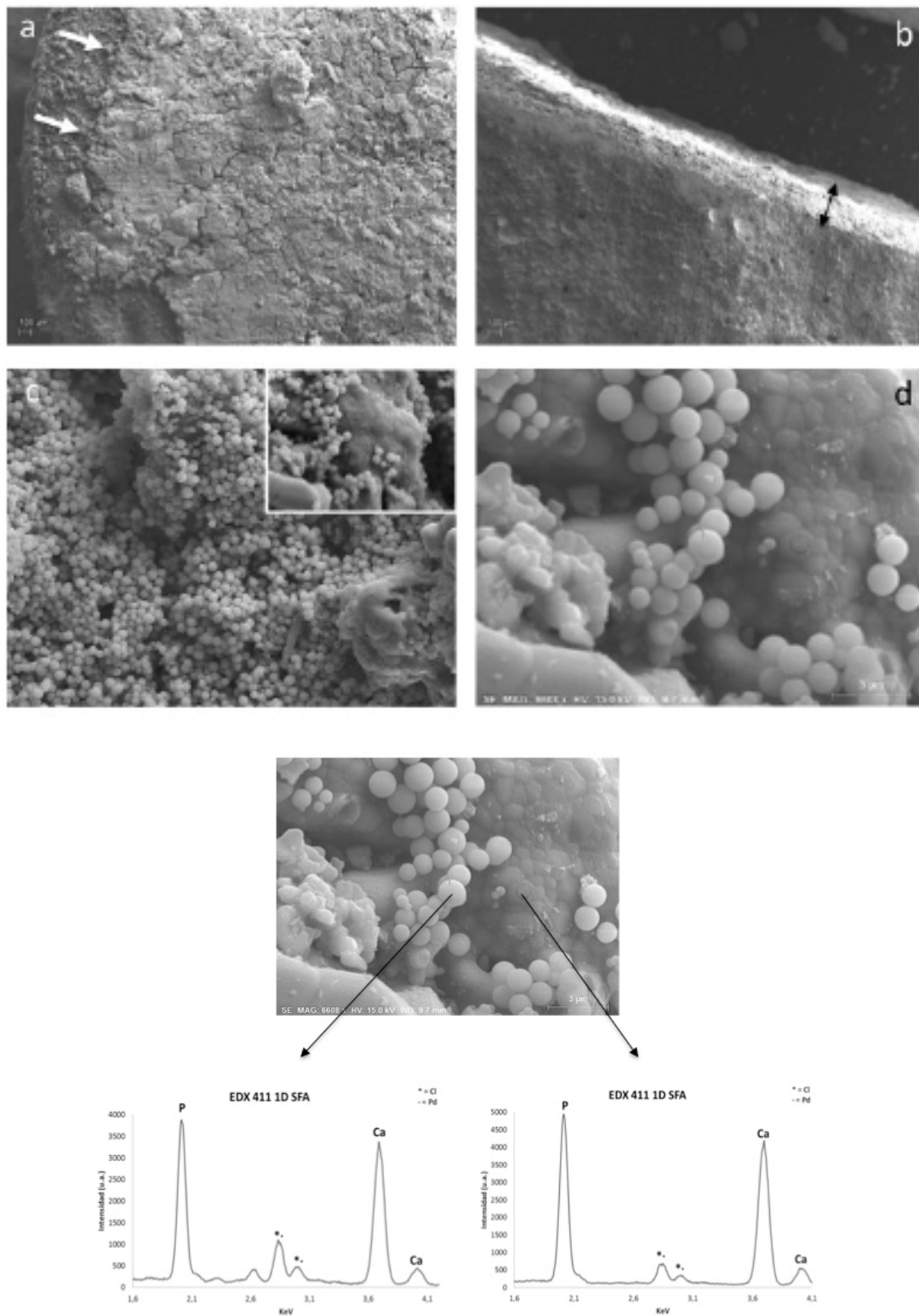


FIG. 7

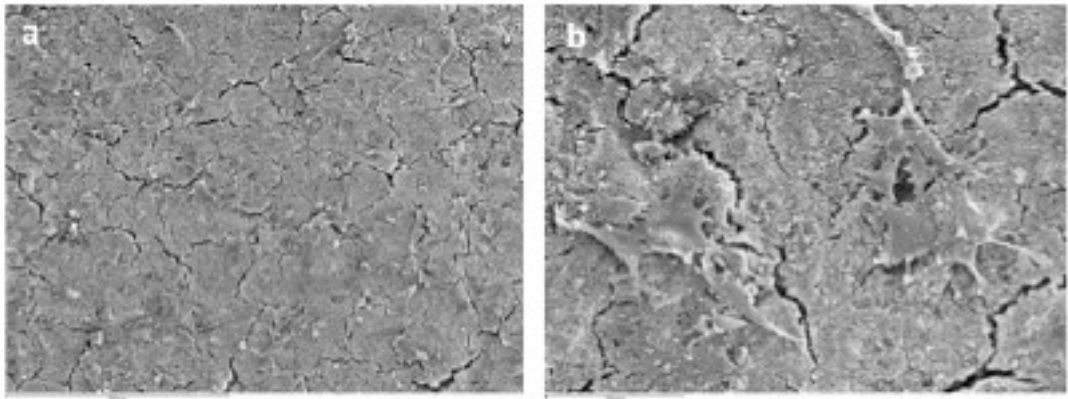


Fig. 8-A

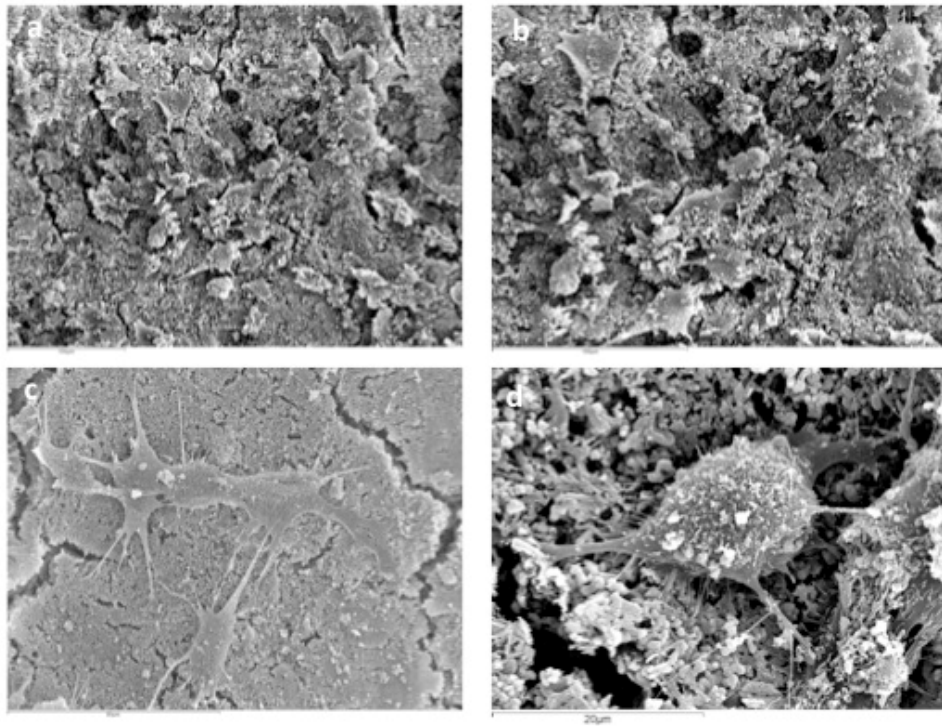


Fig. 8-B

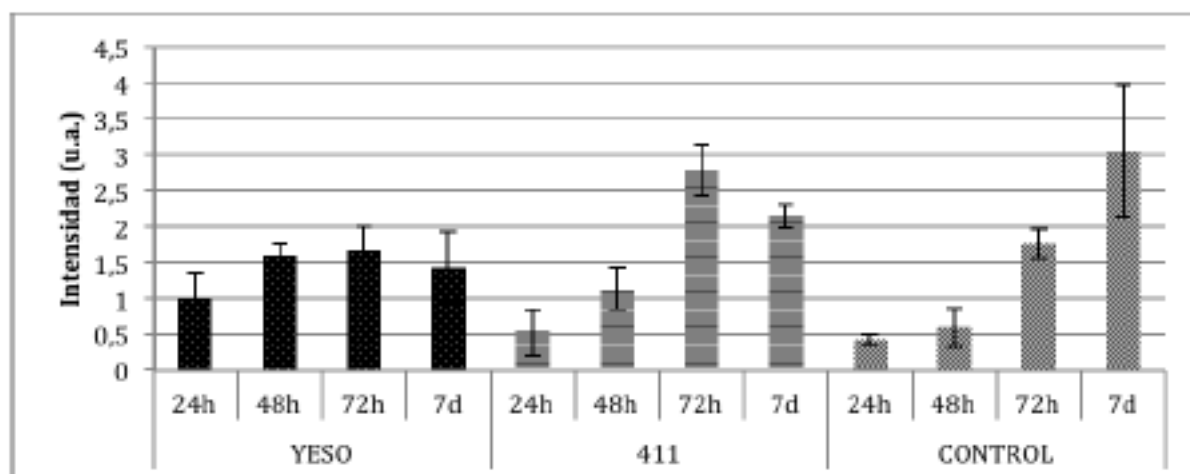


Fig. 8-C