



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 330 823**

⑫ Número de solicitud: 200800516

⑮ Int. Cl.:

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

C08J 9/28 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.02.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2009**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.12.2009

⑰ Solicitante/s: **Universidad Politécnica de Valencia
CTT-Edif. 6G - Camino de Vera, s/n
46022 Valencia, ES
Fundación de la Comunidad de Valencia, Centro
de Investigación Príncipe Felipe**

⑱ Inventor/es: **Gómez Ribelles, José Luis;
Lebourg, Myriam;
Monleón Pradas, Manuel y
Suay Antón, Julio José**

⑳ Agente: **No consta**

② Título: **Estructura híbrida co-continua para la regeneración de defectos óseos.**

③ Resumen:

Estructura híbrida co-continua para la regeneración de defectos óseos.

La presente invención describe un procedimiento para la obtención de un scaffold que consiste en una matriz porosa de PCL y un recubrimiento de hidroxiapatita que comprende: (i) preparar una disolución homogénea de PCL en una mezcla de dos disolventes, un disolvente de PCL, y un no-solvente de PCL, (ii) rellenar un molde con dicha disolución homogénea; (iii) enfriar la disolución homogénea hasta una temperatura inferior a la temperatura a la que se produce la separación de dos fases líquidas; (iv) tratamiento isotérmico; (v) solidificar ambas fases disminuyendo la temperatura; (vi) extraer el disolvente de PCL y el no-solvente de PCL, con un tercer disolvente; y (vii) deposición de HAp biomimética. El soporte es útil en aplicaciones de ingeniería tisular.

ES 2 330 823 A1

DESCRIPCIÓN

Estructura híbrida co-continua para la regeneración de defectos óseos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la ingeniería tisular, y más particularmente se refiere a un soporte macroporoso tridimensional, que comprende una matriz porosa de policaprolactona y un recubrimiento de hidroxiapatita biomimética. La invención se refiere asimismo al procedimiento de obtención de dicho soporte, así como al empleo del mismo en aplicaciones como la regeneración de tejido óseo.

Antecedentes de la invención

Debido al padecimiento de cánceres, accidentes o por degeneración ósea se puede producir una pérdida masiva de tejido óseo, y dar lugar a la necesidad de un injerto óseo. Un injerto óseo ideal para reparar defectos óseos debería permitir a las células óseas crecer en el área afectada, para restaurar la función e integridad física del hueso. Hoy en día, los autoinjertos son la opción preferida para la reparación ósea porque son biocompatibles y no hay riesgo de transmisión de enfermedades. Sin embargo, las limitaciones de los autoinjertos son la escasa cantidad de tejido obtenible, la doble operación necesaria para llevar a cabo el injerto, y la morbilidad en el sitio de extracción, generalmente asociado con molestias y sufrimiento para el paciente. Aloinjertos, que consistan en el injerto del tejido extraído del hueso de un cadáver, son también soluciones pero se descartan cada vez más por el riesgo de transmisión de enfermedades y de rechazo inmunológico.

Para resolver los problemas asociados con los injertos óseos, muchos investigadores han intentado desarrollar sustancias artificiales que puedan servir de injerto óseo. En el estado de la técnica se definen las cualidades que debe poseer tal material para ser implantado exitosamente. Primero, el material debe ser biodegradable para que conforme el nuevo hueso vaya formándose pueda crecer en el sitio de injerto, puesto que éste va desapareciendo con el tiempo. Tanto el material como sus productos de degradación deben ser biocompatibles, para no presentar riesgo alguno para la salud del paciente. Segundo, el material debe mantener unas características mecánicas parecidas a las del hueso, para que las cargas transmitidas en el implante favorezcan la remodelación del tejido óseo y la calcificación.

Tercero, el material debe ser osteoconductor, es decir, debe proporcionar a las células un soporte para adherirse y proliferar hasta colonizar todo el implante. Materiales osteoconductivos incluyen las cerámicas a base de fosfato cálcico, como la hidroxiapatita (componente natural inorgánico del hueso), el trifosfato de calcio o los biovidrios (Bioglass®).

Las cerámicas y biovidrios son compatibles por el parecido de su estructura química con la del hueso nativo, sin embargo son difíciles de procesar, sobre todo en forma porosa, y no tienen la flexibilidad que otorga al hueso su parte orgánica, el colágeno, siendo muy rígidas y quebradizas. Además, las hidroxiapatitas sinterizadas son altamente cristalinas y no se degradan con facilidad, lo que a largo plazo puede impedir una regeneración completa del hueso.

Polímeros biodegradables que despiertan mucho interés en el campo de la ingeniería tisular son por ejemplo la policaprolactona (PCL), el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), el ácido (láctico-co-glicólico), etc. Son fáciles de conformar y de transformar, y se degradan a una velocidad que se puede adaptar al ritmo de regeneración del hueso. Aunque se puede sintetizar scaffolds a partir de ellos de forma sencilla y lograr que tengan buenas propiedades mecánicas, los polímeros puros no son ideales para este uso ya que no son muy osteoconductivos. El hueso neoformado no se adherirá o no crecerá bien en los materiales puros.

Debido a este hecho, lógicamente, la atención de las nuevas investigaciones realizadas se ha volcado sobre materiales compuestos (que a semejanza del hueso, que combina una fase orgánica, el colágeno, con una fase inorgánica, la hidroxiapatita), contengan a la vez polímero y cerámica. Para conseguir el material compuesto se incorporan partículas inorgánicas específicas de tamaño reducido a una matriz del polímero seleccionado. Además de una mejora de propiedades mecánicas debida al efecto reforzante de dichas partículas, se espera que crezca la bioactividad y la osteoconductividad del soporte. Diversos estudios han demostrado la viabilidad de este planteamiento (Biomaterials, in press; Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions *in Vitro*, Lauren Shor, Selcuk Guceri, Xuejun Wen, Milind Gandhi, Wei Sun). Sin embargo, la cantidad de partículas que afloran a la superficie es bastante pequeña y el efecto osteoinductivo consecuentemente también lo es. Es por ello que se hace necesaria una cantidad de carga muy elevada para que este efecto sea significativo.

Un procedimiento propuesto por Kokubo *et al.* [Biomaterials 27 (2006) 2907-2915- How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? Tadashi Kokubo, Hiroaki Takadama] para cuantificar la osteoinductividad de un soporte es la inmersión en un fluido corporal simulado (disolución acuosa con la misma cantidad de electrolitos que el plasma sanguíneo). Una prueba de la osteoinductividad es haber conseguido la deposición en la superficie del material de una fase inorgánica a base de fosfato cálcico, parecida a la hidroxiapatita del hueso.

En numerosos trabajos se plantean procedimientos para que hidroxiapatita biomimética se pueda nuclear en la superficie del material polimérico a fin de aumentar la adhesión celular y la bioactividad. La presencia de hidroxiapatita biomimética en el injerto puede favorecer la remodelación del hueso por redisolución de la apatita depositada.

Adicionalmente y debido a un mayor exceso de iones en el medio, la presencia de la hidroxiapatita puede servir para regular el pH del medio alrededor del injerto ya que algunos productos de degradación de los polímeros son ácidos (por ejemplo en el caso del ácido poliláctico). Se han desarrollado técnicas para recubrir de hidroxiapatita biomimética distintos materiales poliméricos siempre que éstos tengan grupos funcionales de tipo hidroxilo tales como los carboxi-
 5 los, silanoles, TiOH, etc... Los resultados publicados [Preparation of bonelike apatite composite for tissue engineering scaffold; Hirotaka Maeda, Toshihiro Kasuga, Masayuki Nogamia, Minoru Ueda; Science and Technology of Advanced Materials 6 (2005) 48-53] permiten intuir que las propiedades biológicas de tal apatita son significativamente mejores que las de los fosfatos cálcicos o apatitas sintéticas tradicionales. Las causas que explican estos mejores resultados son variadas. Entre otras destaca que el tamaño medio del cristal de apatita formada por este procedimiento es pequeño,
 10 lo cual favorece la redisolución de los cristales 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 conoce en el estado de la técnica solicitudes de patentes, que describen la preparación de "scaffolds" con
 15 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 0,5-3,5 mm, preferentemente entre 1-2 mm. Este soporte se prepara
 20 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, que comprende micropartículas bioactivas que podrían inducir al tejido óseo humano a regenerarse. El soporte usa la
 25 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. 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 hidroxiapatita (HAp), obtenido a partir de una mezcla de fosfato cálcico, óxido de calcio y un porógeno inorgánico que puede ser eliminado
 35 del soporte una vez formado. Este material es totalmente inorgánico, no tiene 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.

De lo anterior se desprende que ninguno de los soportes macroporosos tridimensionales descritos en el estado
 40 de la técnica, cumple con todos los requisitos necesarios y deseables para su aplicación eficaz y satisfactoria en ingeniería tisular. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en el estado de la técnica de proporcionar soportes híbridos macroporosos tridimensionales alternativos, que superen al menos parte de las desventajas de los soportes del estado de la técnica.

En este sentido los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente, que es posible obtener
 45 un nuevo soporte tridimensional de policaprolactona (PCL) y una fase inorgánica de hidroxiapatita (HAp) biomimética, mediante un nuevo procedimiento de preparación basado en la combinación de un método de separación de fases líquidas con la extracción de disolvente solidificado a baja temperatura con un disolvente específico. El procedimiento es reproducible, y permite controlar el tamaño de los poros del nuevo soporte comprendido entre algunas micras a
 50 varios cientos de micras.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: una gráfica que muestra la variación de temperatura (°C) del punto de nube para distintas disoluciones
 55 homogéneas, en función de la concentración de PLC (entre 3%-20%), y del porcentaje de agua (entre 10%-15%) en la mezcla de disolventes agua y dioxano.

Fig. 2 a, b, c: Microfotografías SEM de scaffolds obtenidos por sublimación en frío de mezclas ternarias dioxano/agua-PCL (de composición 88/12-10 con 1% de tween 80) variando el tiempo de tratamiento térmico por debajo
 60 del punto de nube.

Fig. 3 a, b: Microfotografías SEM de un scaffold recubierto con una densa capa de hidroxiapatita tras tratamiento de nucleación y una semana de inmersión en SBF (x5000)

Fig. 4 a, b: Imagen de microscopio de la muestra precedente, y el espectro de rayos X correspondiente tomado en
 65 el punto indicado en la imagen

Fig. 5: micrografía SEM de un scaffold con un tamaño medio de poro inferior a 10 micras

Fig. 6: micrografía SEM de un scaffold con un tamaño medio de poro superior a 50 micras.

Objeto de la invención

En un aspecto la presente invención se refiere a un nuevo soporte híbrido tridimensional que consiste en una matriz polimérica orgánica de policaprolactona y una fase inorgánica consistente en un recubrimiento de HAp biomimética. El nuevo soporte híbrido presenta una morfología particular con una red de poros perfectamente interconectados entre sí de tamaño comprendido entre 5 y 300 micras.

En otro aspecto la invención se refiere a un nuevo procedimiento de obtención del soporte híbrido.

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

En otro aspecto la invención se refiere al empleo del soporte híbrido en aplicaciones como la generación o regeneración de tejido, por ejemplo, tejido conectivo, como hueso o cartílago.

En otro aspecto adicional la invención se relaciona con un procedimiento para generar o regenerar tejido que comprende obtener 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 invención

En un aspecto la presente invención se refiere a un soporte híbrido macroporoso tridimensional, también denominado en adelante “scaffold” o soporte de la invención, que consiste en una matriz porosa de policaprolactona (PCL) y un recubrimiento de hidroxiapatita biomimética que recubre las superficies internas de los poros de la matriz. El soporte presenta una estructura de poros perfectamente interconectados entre sí, y de tamaños comprendidos entre 5 y 300 micras. En este sentido, la Figura 5 muestra una microfotografía SEM de un soporte según la invención que presenta poros de menos de 10 micras; y la Figura 6 muestra la microfotografía SEM de un soporte con poros de tamaño superior a 50 micras que pueden ser invadidos por células de muy diversos tejidos biológicos.

La adherencia del recubrimiento de HAp biomimética a la matriz polimérica es muy elevada y consigue conferir al “scaffold” buenas propiedades mecánicas. 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.

Las características del soporte de la invención, varían en función de su composición química y del procedimiento de obtención. En este sentido el soporte de la invención puede presentar una porosidad comprendida entre 70 y 90%; además el soporte puede presentar diferentes propiedades, y ser desde soporte esponjosos, muy deformables, cuya deformación plástica les permite adoptar la forma de un hueco preexistente, hasta soportes elásticos con módulos comprendidos entre 0,05 y 2 MPa.

El soporte de la invención presenta además otras ventajas, que lo hacen especialmente interesante en aplicaciones tisulares, como la regeneración ósea.

La matriz es PCL, un polímero biodegradable, biocompatible y bioreabsorbible, que está además aprobado para su uso clínico. El término “biocompatible” se refiere en la presente invención a que no sea tóxico y a que permita a las células colonizarlo. El término “bioreabsorbible” 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 soporte de la invención presenta asimismo buenas propiedades de osteointegración y osteoinducción; induce la proliferación y diferenciación de osteoblastos, induce la formación y calcificación de hueso nuevo, y restituye la función fisiológica a nivel molecular y celular. En este sentido el soporte puede implantarse “*in vivo*”. Opcionalmente, el soporte puede sembrarse con células “*in vitro*” previo a su implantación.

La estructura del soporte híbrido, se observa en las Figuras 3 a y b en las que se muestra claramente que la matriz PCL, y la fase de hidroxiapatita biomimética se entremezclan de manera altamente interpenetrada y constituyen fases continuas.

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

(i) preparar una disolución homogénea de PCL en una mezcla de dos disolventes D1 y D2, opcionalmente en presencia de un surfactante;

(ii) rellenar con la disolución homogénea un molde con la forma y dimensiones de la pieza de soporte que se desee obtener;

(iii) enfriar la disolución hasta una temperatura inferior a la temperatura a la que se produce la separación de dos fases líquidas;

(iv) mantener la temperatura alcanzada en la etapa (iii) hasta alcanzar la morfología de las fases deseada;

(v) solidificar ambas fases disminuyendo la temperatura;

(vi) extraer los solventes D1 y D2 con un tercer disolvente D3 en el que el PCL es insoluble, a una temperatura inferior a la temperatura de fusión de D1 y D2, y a la que D3 se encuentra en estado líquido; o alternativamente por sublimación en frío (freeze drying)

(vii) deposición de HAp biomimética.

La etapa (i) se lleva a cabo generalmente a una temperatura igual o superior a la temperatura ambiente, a la cual la PCL es soluble en la mezcla de D1 y D2 en la proporción D1/D2 utilizada obteniéndose una disolución homogénea de PCL en una mezcla de los dos disolventes D1 y D2. Si a temperatura ambiente la mezcla seleccionada no es homogénea se calienta; el experto en la materia puede reconocer fácilmente en cada caso la temperatura necesaria para obtener una disolución homogénea que dependerá de la concentración de PCL, no solvente, y eventualmente el surfactante. Por temperatura ambiente se entiende entre 20°C y 25°C. El surfactante puede ser un surfactante convencional, comercial o un diblock anfífilo. D1 es un disolvente de la PCL y D2 es un no-solvente de la PCL. A modo ilustrativo entre los disolventes de la PCL se pueden mencionar entre otro, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de metileno, acetato de etilo, cloroformo, n-heptano, n-hexano, n-pentano, dioxano, benceno, xileno, naftaleno, dimetilformamida, ácido acético, acetona, y mezclas de los anteriores. Ejemplos de no-solvente son entre otros agua, etanol y sus mezclas.

En la presente descripción las proporciones de D1, D2 y PCL en la mezcla se indican de la siguiente manera: $X_{D1}/X_{D2} - X_{pol}$, con $X_{D1} + X_{D2} = 100$, siendo X_{D1} y X_{D2} las proporciones en peso de cada disolvente en la mezcla solvente, y X_{pol} la proporción en peso de polímero en la disolución.

En la etapa (ii) una vez rellenado el molde con la disolución homogénea, ésta vuelve a homogeneizarse a la temperatura anterior para paliar una eventual diferencia de temperatura del molde. El molde tiene que soportar los disolventes y los cambios bruscos de temperatura durante el 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.

En la etapa (iii) la disolución homogénea se enfría, y se separan dos fases; una de las fases está formada mayoritariamente por la disolución del PCL en el disolvente D1 y la otra fase mayoritariamente por una mezcla de los disolventes D1 y D2. A la temperatura a la cual la disolución se vuelve turbia se le denomina “punto de nube”. La disolución se vuelve turbia como consecuencia de la dispersión de la luz en los núcleos microscópicos de una fase en la otra: es un indicador del momento donde se pasa de la zona monofásica del diagrama de fases a una zona heterogénea (presencia de varias fases). La dependencia del “punto de nube”, que permite fijar el resto de condiciones del tratamiento térmico, con la composición de la disolución, depende de la concentración de PCL y los disolventes D1 y D2 empleados, y puede determinarse en cada caso (ver Figura 1). La temperatura alcanzada en la etapa (iii) es inferior a la del punto de nube, típicamente 5°C por debajo de éste.

En la etapa (iv) se mantiene la temperatura alcanzada en la etapa (iii) durante un tiempo generalmente comprendido entre 3 y 30 minutos, hasta alcanzar la morfología de las fases deseada, es decir, hasta que las inclusiones esféricas de fase pobre en PCL alcancen el tamaño de poro deseado para el scaffold.

El proceso de separación de fases líquidas está controlado cinéticamente, lo que significa que la distribución, el tamaño y la forma de las dos fases coexistentes varía en función de la profundidad de temple por debajo de la temperatura del “punto de nube” (iii) y/o del tiempo de tratamiento isoterma de la mezcla a la temperatura inferior al punto de nube, en la etapa (iv).

Cuando el sistema formado por las dos fases, todavía en fase líquida, alcanza la morfología deseada se disminuye bruscamente la temperatura (etapa (v)) solidificando ambas fases por cristalización de los disolventes y cristalización parcial del polímero. Es deseable un enfriamiento rápido tal como el que se produce por inmersión en nitrógeno líquido (temple), para limitar la evolución ulterior de la estructura.

A continuación se extraen los solventes D1 y D2 con un tercer disolvente D3 en el que el PCL es insoluble, a una temperatura inferior a la temperatura de fusión de D1 y D2, y a la que D3 se encuentra en estado líquido. Los disolventes D1 y D2 se disuelven en D3. D3 puede ser un alcohol de bajo punto de fusión, siendo obligatorio tener el punto de fusión de D3 muy por debajo del de D2. En una realización particular se introduce el sistema congelado en etanol a -20°C hasta conseguir la completa disolución de D1 y D2, dejando únicamente la PCL con la arquitectura porosa derivada de la estructura formada durante la separación de fases líquidas, y se procede a secarlo a vacío y a temperatura ambiente hasta la completa eliminación del disolvente D3.

Alternativamente la extracción se puede llevar a cabo por sublimación en frío (freeze drying).

La etapa final de deposición de hidroxiapatita biomimética en la superficie del soporte se realiza según la técnica convencional de recubrimiento de hidroxiapatita biomimética, que consiste en depositar los minerales que componen el material cerámico del hueso desde un fluido corporal simulado (SBF) por inmersión de la matriz polimérica en dicho fluido rico en iones con una composición en iones cercana al plasma humano como ocurre en el cuerpo (tabla 1). La deposición de hidroxiapatita biomimética 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 poros de la PCL grupos carboxilos, adecuados para nuclear fósforo cálcico. A continuación en la etapa 2) se generan núcleos de fosfato cálcico en la superficie de los microporos y macroporos del soporte, mediante la inmersión alternada del soporte obtenido en 1) en soluciones conteniendo respectivamente Ca^{2+} y 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 corporal simulado por un periodo de tiempo comprendido entre unos días y dos semanas. Cuanto mayor sea el tiempo, mayor será el espesor de la capa recubrimiento de hidroxiapatita biomimética creada, según la aplicación requerida. Alternativamente el soporte obtenido en 2) puede sumergirse en otra solución modificada. La composición del fluido corporal simulado (SBF) puede modificarse para acelerar el proceso de deposición o para incluir iones que no están presentes en el medio normal pero pueden tener propiedades osteoinductivas (por ejemplo el flúor).

En una realización preferente se utiliza la siguiente composición iónica del fluido corporal simulado (SBF) tamporada con ácido clorhídrico e hidrocloreto de tris (hidroximetil)aminometano de la Tabla 1:

TABLA 1

componente	peso (g/l)
NaCl	15,99
KCl	0,45
$\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	1,10
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,61
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	0,32
NaHCO_3	0,71
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$	0,46

El soporte se sumerge durante un tiempo típicamente comprendido entre 24 horas y 2 semanas. Dependiendo del tiempo se genera un recubrimiento de hidroxiapatita 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. Como muestran las imágenes de microfotografía SEM (Figuras 3 y 4) la hidroxiapatita biomimética depositada cubre todas las superficies internas de los poros, constituyendo una fase continua, y originando la estructura híbrida interpenetrada del soporte de la invención.

A continuación el soporte se lava con agua destilada y se seca, por ejemplo en un desecador a vacío. Puede esterilizarse de acuerdo con cualquier método convencional, almacenarse o acondicionarse para su uso.

Para proceder a una separación de fase líquido-líquido, es necesario conocer el diagrama de fase del sistema ternario solvente/no-solvente/PCL que se elige. Asimismo en el procedimiento de la invención resulta determinante controlar la relación existente entre la composición de la disolución en cuanto a las fracciones en peso de PCL y de los disolventes D1 y D2 (X_{D1} , X_{D2} , X_{pol}), el tratamiento térmico y la morfología de fases para obtener de forma precisa y reproducible un soporte según la invención. Esto se ilustra en los ejemplos 1 y 2.

Las características del soporte de la invención pueden variarse de forma sencilla por un experto en la materia dentro de los intervalos descritos en la presente invención para adaptarse a las necesidades requeridas por la aplicación concreta. Las Figuras 5 y 6 muestran cómo pueden obtenerse por este procedimiento arquitecturas de estructura porosa

muy variables, desde estructuras con pequeños poros, de algunas micras, que están perfectamente interconectados (Figura 5), hasta poros de gran tamaño que pueden ser invadidos por células de muy diversos tejidos biológicos (Figura 6).

Como ya se mencionó anteriormente, los soportes híbridos de la invención son adecuados para su aplicación en ingeniería tisular.

Por tanto en otro aspecto la invención proporciona el empleo del soporte de la invención para su uso aplicaciones tisulares, en la generación o regeneración de tejido. Para formas no complejas de “scaffold” se pueden utilizar después de su obtención, diversas herramientas de corte para obtener la geometría deseada para su uso concreto.

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 cartilago. Los soportes bioactivos y los soportes híbridos se utilizan *in vivo* o *in vitro*.

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

proporcionar un soporte híbrido según la presente invención, y

cultivar *in vitro* en dicho soporte células de un tejido,

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

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.

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 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 sembrándolo con dichas células.

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

1. Preparación de un scaffold

Ejemplo 1

Determinación del diagrama de fase de disoluciones dioxano/agua/polímero

Se prepararon varias disoluciones dioxano/agua-PCL, variando tanto la concentración de PCL entre 3% y 20% como la de agua en la mezcla de disolventes agua y dioxano entre 10% y 15%. Las mezclas se calientan hasta estar en la zona monofásica, donde la disolución tiene un aspecto transparente y homogéneo. Esta zona, donde la mezcla ternaria dioxano-agua-PCL es homogénea, se sitúa por encima de las curvas de la Figura 1. A continuación se bajó la temperatura gradualmente, dejándose a una temperatura dada 10 minutos, observando, y bajando otro grado, etc. Los puntos de las curvas indican la temperatura a la que empieza la separación de fases para un sistema dado. La Figura 1 muestra como para distintas concentraciones de PCL comprendidas entre 3% y 20%, y para diferentes porcentajes de agua varía la temperatura del “punto de nube”. En este sentido, el punto de nube aumenta fuertemente y linealmente con la proporción de no-solvente (agua) en la mezcla, cuesta más disolver el polímero pues hay menos afinidad entre el líquido y el polímero. Pasa lo mismo, aunque en menor grado, para la concentración de polímero: cuanto más polímero hay en la disolución, más cuesta disolverlo, por lo cual la curva con la mayor concentración (20% PCL) es superior a todas las demás. Para todas las series, la tendencia observada es la misma, y para un rango estrecho de concentraciones, la pendiente de la curva no cambia significativamente (Cf. concentraciones de 3, 5, 8%).

El cuadro en puntillos representa el intervalo de temperaturas donde se puede trabajar cómodamente. No se puede trabajar a temperaturas altas, pues el equilibrio liquido-vapor del solvente se desplaza del lado del vapor, y por consecuencia se altera la concentración de la mezcla. Tampoco es deseable trabajar a temperaturas más bajas que el ambiente, pues requiere más equipamiento y un control de temperatura más refinado; además a bajas temperaturas se puede producir tanto la cristalización del dioxano ($T_{\text{fusión}}: 11^{\circ}\text{C}$) como el gel del polímero (cristalización en disolución) que en definitiva produce una solidificación, impidiendo la separación de fases líquido-líquido en beneficio de una separación de fases líquido-sólido.

ES 2 330 823 A1

La adición de cualquier sustancia surfactante, espesante, u otra, modifica el equilibrio de fases, por lo cual se ha de volver a calcular el diagrama.

5 Ejemplo 1.2

Influencia del tiempo de nucleación sobre la estructura del scaffold

Asimismo se ha determinado como varía la microestructura del soporte obtenido en función del tiempo de tratamiento isoterma, (3, 10 y 15 minutos) en particular a 5°C por debajo del punto de nube (Figura 2 a, b, c) para sistemas 88/12-10 (dioxano/agua-PCL) y 1% de tween80. El sistema dioxano-agua-PCL 88/12-10 es una disolución que contiene un 10% en peso de PCL en una mezcla de dioxano y agua en la que el porcentaje de dioxano es el 88% en peso.

Se preparó una mezcla de dioxano/agua en proporción 88/12. Se añadió 10% en peso de PCL respecto al líquido, y 1% en peso de Tween 80. La temperatura del punto de nube de tal mezcla se determinó por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.1, y se obtuvo un valor de 37°C. La mezcla se homogeneizó durante un cuarto de hora en la zona monofásica a 40°C, a continuación se enfrió en un baño a 32°C, en la zona bifásica, a $T_{\text{nube}}-5^{\circ}\text{C}$. Se dejó en esta zona para que la separación de fase líquido-líquido se produjera, durante 3, 10 y 15 min y se observó la influencia del tiempo de nucleación sobre el tamaño de poro obtenido. A continuación, se enfrió bruscamente por inmersión en nitrógeno líquido, lo que congela la estructura tal como está. Después se procedió a la extracción del disolvente (mezcla dioxano agua) a baja temperatura por otro disolvente que no es solvente del polímero, en este caso el etanol. Se cambió el etanol de extracción tres veces, y después se procedió al secado de la muestra.

Tal y como se observa en las Figuras 2 a,b y c cuanto mayor es el tiempo de nucleación mayor es el tamaño de los poros obtenidos. En cualquiera de los tiempos utilizados se observa sin embargo la interconexión entre los poros formados.

30 Ejemplo 1.3

Nucleación de una fase inorgánica similar a la apatita del hueso para obtener la estructura híbrida

Se sintetizó un scaffold con una mezcla de 88/12 de dioxano y agua, y un 8% en peso de PCL respecto al peso de disolvente, con un tiempo de nucleación de 3 minutos a $T_{\text{nube}}-5$.

El scaffold se trató con una disolución 1 M de hidróxido sódico durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación se trató con disoluciones de cloruro cálcico (0,2 M) y fosfato potásico (0,2 M) para generar núcleos de fosfato cálcico en la superficie.

Después del tratamiento se sumergió el scaffold en fluido corporal simulado, (SBF, Simulated Body Fluid), una solución acuosa cuya composición molar está descrita en la Tabla 2.

Al cabo de una semana se lavó el scaffold con agua destilada, y después con etanol y se secó. Las micrografías presentadas (Fig 3a y 3b) ponen en evidencia la abundante nucleación de una capa mineral encima del soporte sintético. El análisis EDX permite confirmar que esta capa mineral tiene una composición parecida a la hidroxiapatita, el mineral del hueso, por su riqueza en fosfato cálcico y sus impurezas (magnesio, potasio) típicas de la hidroxiapatita biológica.

50 TABLA 2

Composición iónica del fluido corporal simulado y del plasma sanguíneo, (mM/l) A: Fluido corporal simulado; B: plasma sanguíneo

	Concentración en electrolitos						
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻
A	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0
B	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0

REIVINDICACIONES

1. Un soporte macroporoso y tridimensional que consiste en una matriz porosa de policaprolactona y un recubrimiento de hidroxiapatita biomimética que recubre las superficies internas de los poros, interconectados entre sí, y de tamaños comprendidos entre 5 y 300 micras, en el que la matriz porosa de policaprolactona y el recubrimiento de hidroxiapatita se entremezclan y constituyen fases continuas.
2. Soporte según la reivindicación 1, que presenta una porosidad en volumen comprendida entre un 70 y 90%.
3. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que presenta un módulo elástico comprendido entre 0,05 MPa y 2 MPa.
4. Un procedimiento para obtener un soporte según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:
 - (i) preparar una disolución homogénea de PCL en una mezcla de dos disolventes, un disolvente de PCL, y un no-solvente de PCL, opcionalmente en presencia de un surfactante;
 - (ii) rellenar un molde con la disolución homogénea obtenida en la etapa anterior;
 - (iii) enfriar la disolución homogénea hasta una temperatura inferior a la temperatura a la que se produce la separación de dos fases líquidas;
 - (iv) mantener la temperatura alcanzada en la etapa anterior hasta alcanzar la morfología de las fases deseada;
 - (v) solidificar ambas fases disminuyendo la temperatura;
 - (vi) extraer el disolvente de PCL y el no-solvente de PCL, con un tercer disolvente en el que PCL es insoluble, a una temperatura inferior a la temperatura de fusión del disolvente de PCL y del no-solvente de PCL, y a la que el tercer disolvente se encuentra en estado líquido;
 - (vii) deposición de HAp biomimética.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la etapa (i) se lleva a cabo a una temperatura igual o superior la temperatura ambiente.
6. Procedimiento según la reivindicación 4 o 5, en el que el disolvente de PCL se selecciona del grupo formado por tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido, cloruro de metileno, acetato de etilo, cloroformo, n-heptano, n-hexano, n-pentano, dioxano, benceno, xileno, acetona, naftaleno, dimetilformamida, dioxano, ácido acético, acetona y sus mezclas.
7. Procedimiento según la reivindicación 4 o 5, en el que el no-solvente se selecciona del grupo formado por agua, etanol y sus mezclas.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 6 y 7, en el que el disolvente es dioxano y el no-solvente es agua.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la concentración de agua en la mezcla de dioxano y agua está comprendida entre 10% y 15%, y en el que la concentración de PCL está comprendida entre 3% y 20%.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la disolución homogénea se prepara a partir de una mezcla de dioxano/agua en proporción 88/12, 10% en peso de PCL con respecto a la mezcla de disolventes y 1% de tween 80.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que la disolución homogénea se enfría 5°C por debajo de la temperatura del punto de nube, y se mantiene a dicha temperatura durante un tiempo comprendido entre 3 y 30 minutos.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en la que la etapa (v) se lleva a cabo por inmersión del sistema formado por las dos fases en nitrógeno líquido.
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, en el que la etapa (vi) se lleva a cabo en etanol a -20°C.
14. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la etapa (vi) de extracción se lleva a cabo, alternativamente, por sublimación en frío.

ES 2 330 823 A1

15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14, en el que la etapa (vii) 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 cada una iones Ca^{2+} e iones PO_4^{3-} .
- 3) inmersión del soporte obtenido en fluido corporal simulado.

16. Soporte obtenible según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15.

17. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en la generación o regeneración de tejido.

18. Empleo del soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medio útil para la generación o regeneración de tejido.

19. Empleo según la reivindicación 18, en la que el tejido es conectivo.

20. Procedimiento para generar o regenerar tejido que comprende:

obtener un soporte híbrido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y

cultivar *in vitro* en dicho soporte células de un tejido,

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

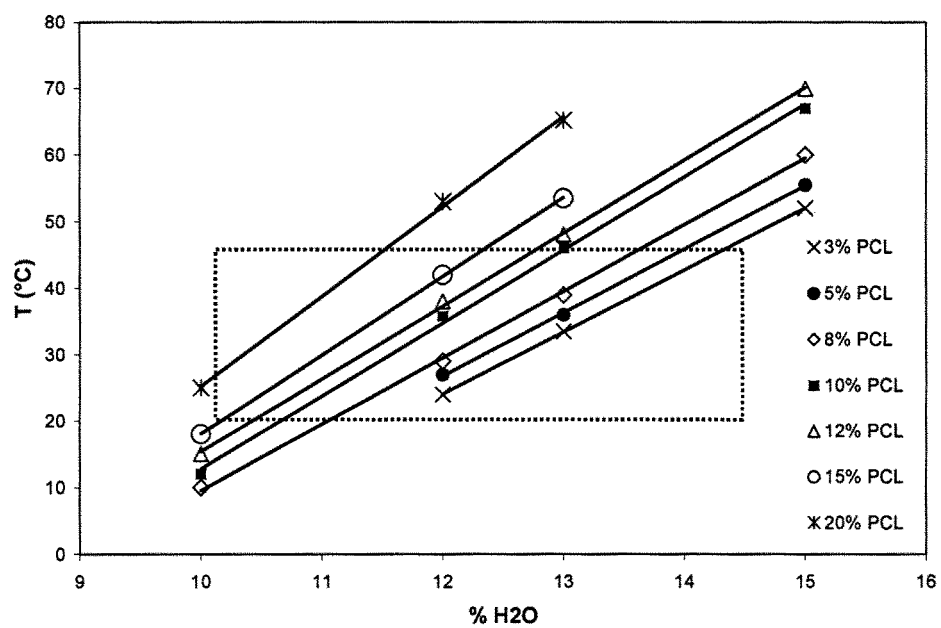


FIG. 1

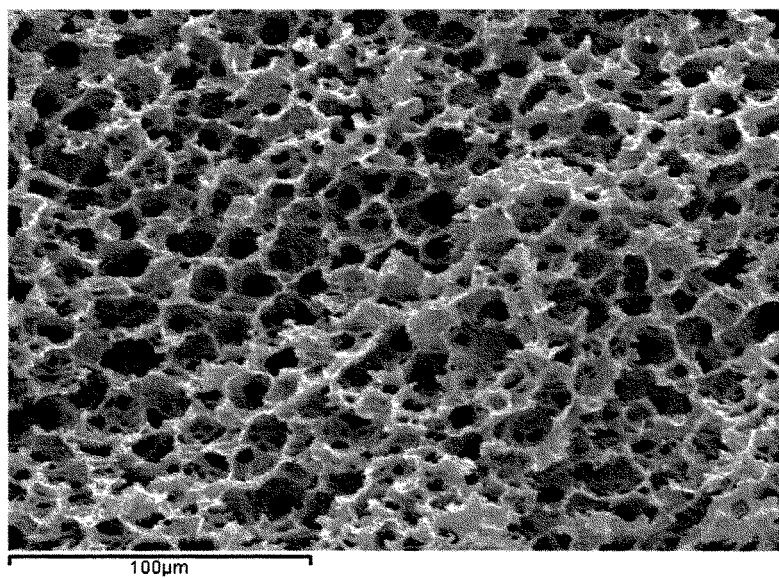


FIG. 2a

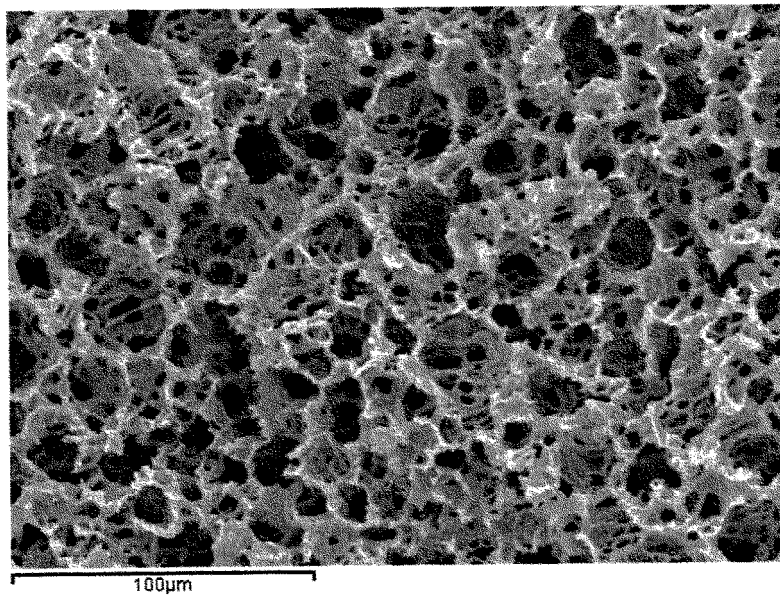


FIG.2b

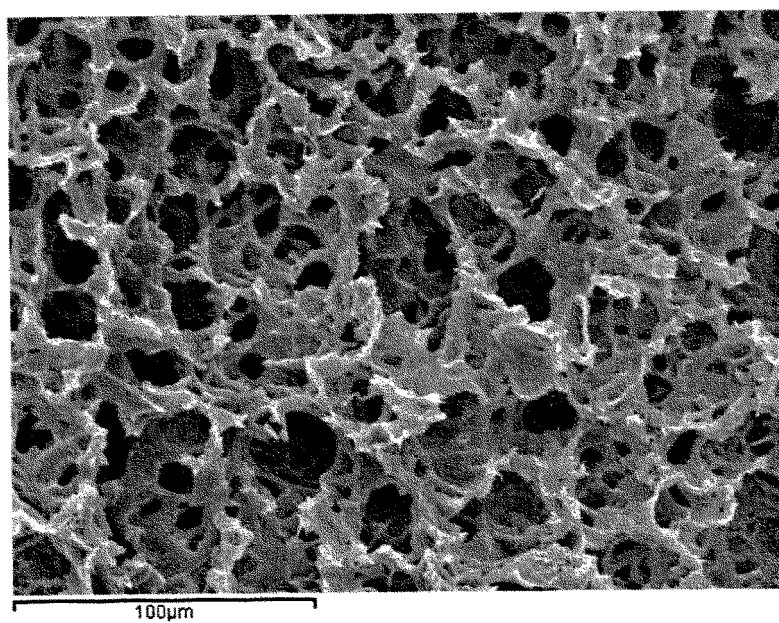


FIG.2c

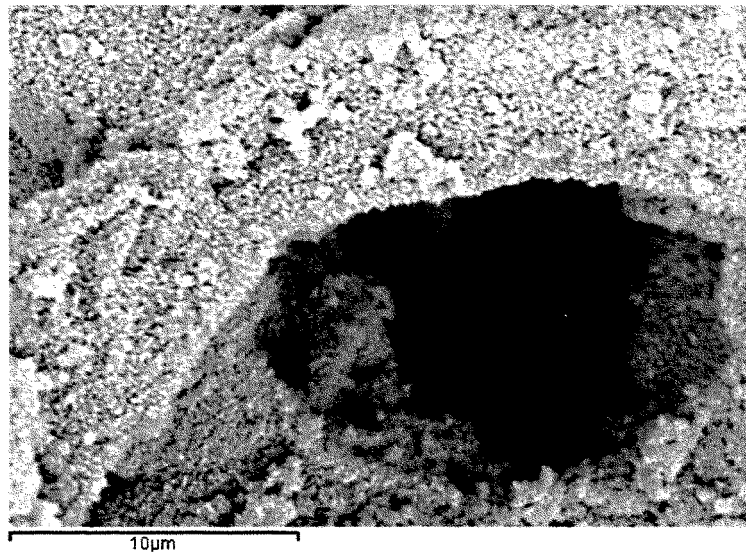


FIG. 3a

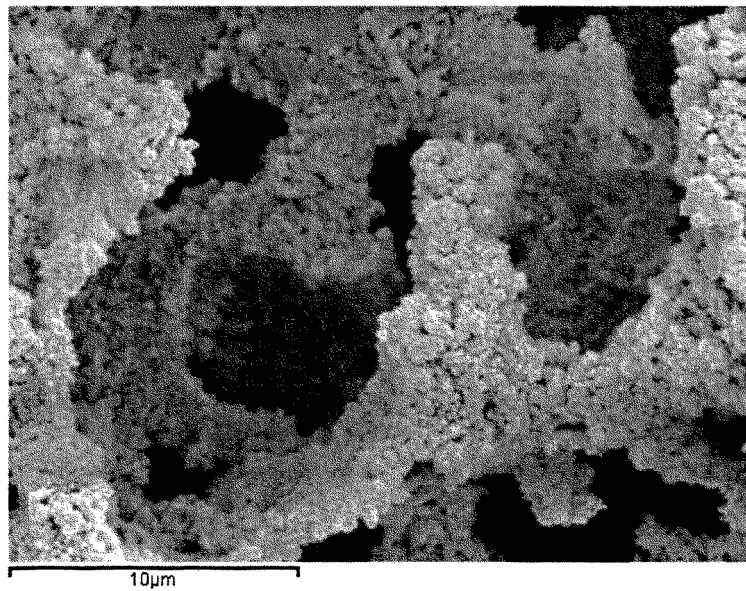


FIG. 3b

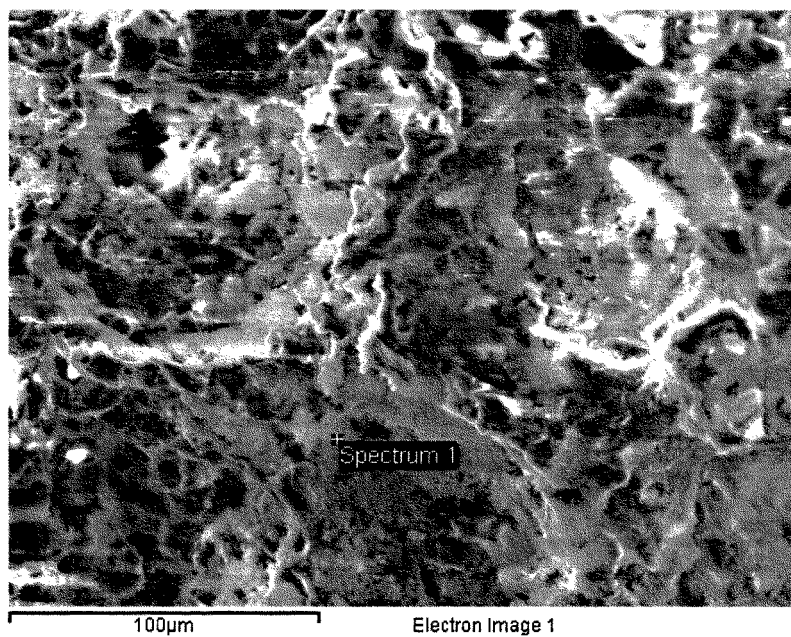


FIG. 4a

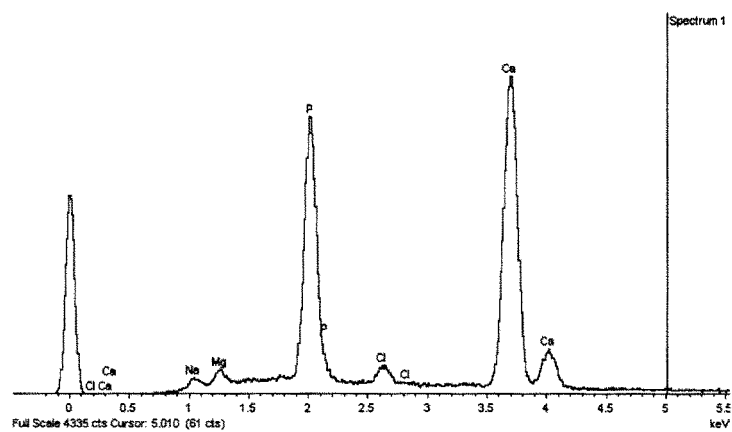


FIG. 4b

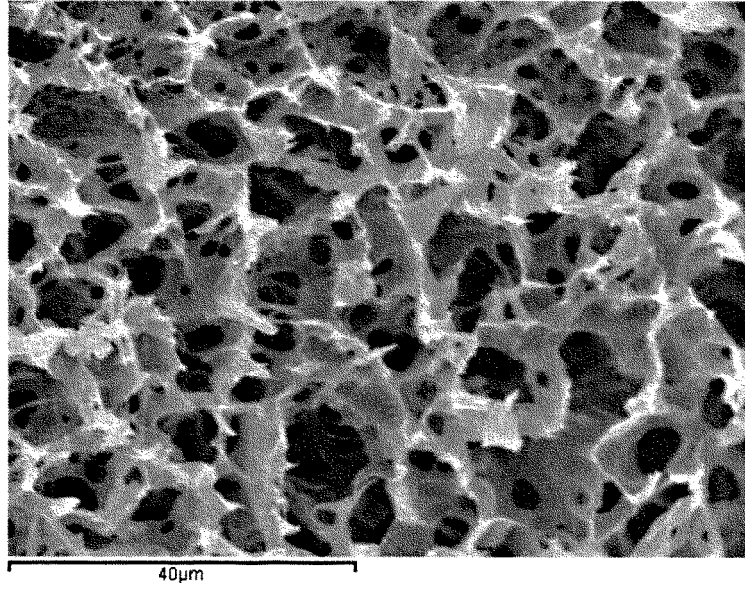


FIG. 5

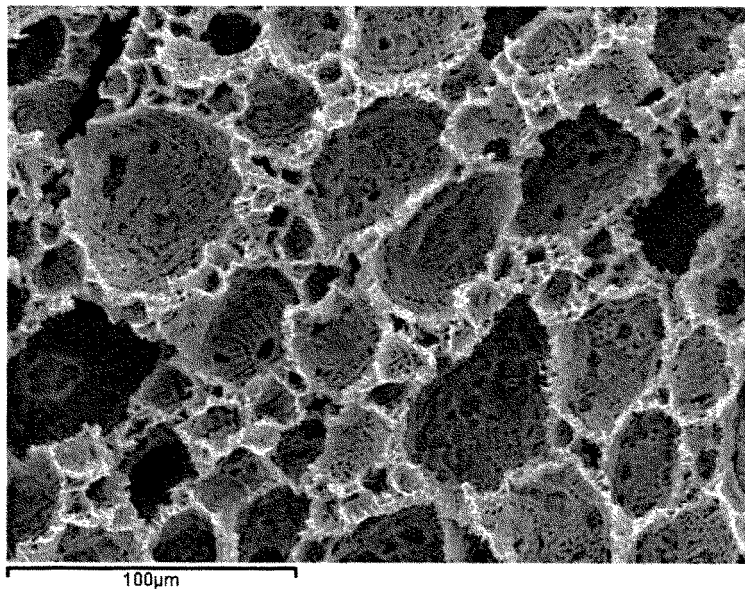


FIG. 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 330 823

⑫ Nº de solicitud: 200800516

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 14.02.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TANAKA, M. et al. "Formation of hydroxyapatite on a self-organized 3D honeycomb-patterned biodegradable polymer film", Colloid and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects, 2008 (disponible en línea 09.06.2007), Volumen 313-314, páginas 515-519. Ver resumen y página 516, Experimental.	1-3,16-20
X	KIM, S.E. et al. "Biodegradable Porous PCL/HA Scaffolds for Bone Tissue Engineering", Key Engineering Materials, 2007, Volumen 342-343, páginas 77-80. Ver página 78: resultados y discusión.	1-3,16-20
X	HYUN, Y-T. et al. "Characterization of PCL/HA composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", Key Engineering Materials, 2007, Volumen 342-343, páginas 109-112. Ver resultados y discusión.	1-3,16-20
A	AU 783073 B (ETHICON INC) 22.09.2005, página 10, líneas 13-21; página 19, línea 24 - página 20, línea 26; página 32, línea 21 - página 37, línea 28; página 42, línea 21 - página 43, línea 22; página 46, líneas 24-28; página 50, líneas 4-28; ejemplo 1.	1-20
A	WO 2007115367 A1 (UNIV QUEENSLAND; UNIV MELBOURNE) 18.10.2007, página 10, línea 16 - página 18, línea 23; página 24, línea 25 - página 25, línea 11.	1-20
A	BAJI, A. et al. "Processing Methodologies for Polycaprolactone-Hydroxyapatite Composites: A Review", Materials and Manufacturing Processes, 2006, Volumen 20, páginas 211-218.	1-20
A	US 6281257 B1 (Ma, P.X. et al.) 28.08.2001, columna 10, línea 42 - columna 12, línea 11.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.11.2009

Examinador

M. del Carmen Bautista Sanz

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01)

C08J 9/28 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

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

A61L, A61F, C08J, C12N

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

INVENES,EPODOC, WPI, NPL, XPESP, CAS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.11.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4-15	SÍ
	Reivindicaciones	1-3, 16-20	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	4-15	SÍ
	Reivindicaciones	1-3, 16-20	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects, Vols. 313-314, pp. 515-519.	01/02/2008
D02	Key Engineering Materials, Vol. 342-343, pp. 77-80.	2007
D03	Key Engineering Materials, Vol. 342-343, pp. 109-112.	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un soporte macroporoso tridimensional formado por una matriz de policaprolactona con poros interconectados recubiertos por hidroxiapatita biomimética, el procedimiento de obtención de tal soporte así como su uso en la regeneración de tejido conectivo. La invención también tiene por objeto un procedimiento para generar o regenerar tejido con el soporte obtenido.

El documento D01 divulga un soporte tridimensional formado por un material compuesto de una matriz de policaprolactona con un recubrimiento de hidroxiapatita biomimética y su procedimiento de fabricación que consiste en disolver el polímero junto con un surfactante en un disolvente (cloroformo) y colar en una placa de vidrio la solución obtenida al mismo tiempo que se inyecta aire húmedo. De esta forma se obtiene una película con estructura de panal de abeja con poros de 10 micrómetros. La adición de hidroxiapatita biomimética se lleva a cabo con un tratamiento previo de la superficie del polímero con NaOH con el fin de mejorar sus propiedades hidrofílicas y posterior adición del mismo a un fluido corporal simulado (SBF) (Ver página 516, Experimental). El soporte divulgado se utilizan en procesos de ingeniería de tejido óseo (Ver resumen).

Los documentos D02 y D03 divulgan materiales compuestos macroporosos de policaprolactona e hidroxiapatita con porosidades a partir del 85% y tamaños de poro comprendidos entre 10 y 500 micrómetros y su uso en la generación de tejido óseo mediante el cultivo de osteoblastos (células MG63) sobre dicho soporte. Los soportes divulgados tienen una estructura macroporosa de poros altamente interconectados con paredes de poros que se engrosan a medida que aumenta el contenido de hidroxiapatita (Ver D02: página 78, resultados y discusión; página 79; D03: Resultados y discusión).

En vista a lo divulgado en los documentos D01 a D03, las reivindicaciones 1 a 3 y 16 a 20 carecen de novedad (Art. 33 (2) PCT).

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica un procedimiento de obtención de soportes macroporosos de policaprolactona e hidroxiapatita biomimética como el recogido en las reivindicaciones 4 a 15 de la solicitud. Por lo tanto, dichas reivindicaciones cumplen con los requisitos de patentabilidad (Arts. 6, 8 y 9 LP).