



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 331 678**

⑯ Número de solicitud: **200800390**

⑮ Int. Cl.:

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 31/12 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO

B2

⑯ Fecha de presentación: **04.02.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2010**

Fecha de la concesión: **27.04.2011**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
13.04.2011

⑯ Fecha de anuncio de la concesión: **10.05.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.05.2011

⑯ Titular/es: **Universidad Politécnica de Valencia
Ctt-Edf. 6G - Camino de Vera, s/n
46022 Valencia, ES
Fundación Comunidad Valenciana Centro
Investigación Príncipe Felipe**

⑯ Inventor/es: **Gómez Ribelles, José Luis;
Suay Antón, Julio José;
Lebourgh, Myriam y
Monleón Pradas, Manuel**

⑯ Agente: **Carpintero López, Francisco**

⑯ Título: **Soportes macroporosos tridimensionales para ingeniería tisular.**

⑯ Resumen:

Soportes macroporosos tridimensionales para ingeniería tisular.

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.

ES 2 331 678 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Soportes macroporosos tridimensionales para ingeniería tisular.

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 puede ser biodegradable y reabsorbible y que comprende una matriz polímerica 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.

15 **Antecedentes de la invención**

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 trasmisión 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 25 osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. Orthop Clin North Am 1999;30:583-8].

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 30 relaciones entre estructura y funciones en tejidos de mamíferos, normales y patológicos; y el desarrollo de 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 tres 35 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 (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].

40 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 crecimiento del hueso (osteocancción) e inducir la diferenciación de las células osteogénicas hacia osteoblastos y osteoclastos (osteoinducción).

45 Varios materiales han demostrado ser osteoconductores (fosfatos cárnicos, 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, 50 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.

55 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.

60 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 65 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 cárnicos etc.,

- 5 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: 10 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- 15 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 Maeda, Toshihiro Kasuga, Masayuki Nogamia, Minoru Ueda, *Science and Technology of Advanced Materials* 6 (2005) 48-53) permiten intuir que las propiedades 20 biológicas de la hidroxiapatita así obtenida son significativamente mejores que las de los fosfatos cárnicos 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.

25

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.

30

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 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 cárneo resorbibles por osteoclastos. Sin embargo, este soporte presenta, entre otras, la desventaja de que su biocompatibilidad es limitada.

35

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.

45

La solicitud US2005255159 describe una composición porosa que comprende un material hidroxiapatita (HAp), obtenido a partir de una mezcla de fosfato cárneo, 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.

50

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 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.

55

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, 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 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 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).

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 funcional y tridimensional. En concreto una de las aplicaciones en la cual resulta de gran utilidad es la fabricación de tiras de fusión intervertebral.

5

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.

10

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 microporos.

15

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

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

20

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.

25

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

30

Figura 7: Muestra el resultado de un análisis de microscopía 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.

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

35

Objeto de la invención

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%.

40

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.

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.

45

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 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 del porógeno.

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

50

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 hueso o cartílago.

55

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 invención

5 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.

20 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. 25 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 30 láctico y etilenglicol (PLLA-co-PEG), copolímeros de lisina ácido láctico, (PPF), copolímeros de etilenglicol y ácido fumárico, polipropilenfumarato, así como sus mezclas. En una realización preferente la matriz polimérica comprende 35 un polímero aprobado para su uso clínico, como por ejemplo policaprolactona (PCL).

40 La matriz polimérica comprende partículas de un material inorgánico adecuado o material de refuerzo, que pueden ser entre otros, hidroxiapatita, fluorohidroxiapatita, disilicuro de calcio, fosfato cálcico, y sus mezclas. En general el tamaño de dichas partículas está comprendido entre 50-300 nm. En una realización preferente las partículas presentan un tamaño inferior a 100 nm de modo que su efecto como refuerzo mecánico del soporte y su biodegradabilidad son 45 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 0,1 MPa y 100 MPa, 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.

50 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 hidroxiapatita, preferiblemente HAp biomimética.

55 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 60 solución de fluido corporal simulado, que simula el plasma sanguíneo y observar como tiene lugar el crecimiento de un recubrimiento de HAp biomimética.

65 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 hidroxiapatita biomimética en la superficie de los macroporos y microporos. La adherencia a la matriz polimérica de la hidroxiapatita 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 in-

terpenetrada. 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.

5 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 10 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.

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

20 (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;

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

25 (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;

30 (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.

35 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 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 metíleno, acetato de etilo, cloroformo, n-heptano, n-hexano, n-pentano, dioxano, benceno, xileno, acetona, naftaleno y sus mezclas. En una 40 realización particular el disolvente es dioxano.

45 El material porógeno puede ser monosacáridos o 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 50 porógeno con respecto al peso de disolución. 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 las partículas de porógeno; de este modo se evita que se aglomeren o acumulen en determinadas partes del soporte de la invención.

55 La mezcla homogénea constituida por un polímero en un primer disolvente, las partículas de refuerzo y las 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. Por ejemplo en la figura 6 se muestra una tira de fusión intervertebral generada según el procedimiento de la invención.

60 El molde tiene que soportar el disolvente orgánico 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.

65 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

- 5 en principio cualquier disolvente orgánico, inorgánico y sus mezclas convencionales. La selección del mismo puede realizarla 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.
- 10 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

15 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)).

20 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.

25 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).

40 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.
- 45 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).

50 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 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 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.

ES 2 331 678 B2

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

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

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 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.

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 hidroxiapatita, 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*.

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

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.

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 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 sembrándolo con dichas células.

ES 2 331 678 B2

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

10 1. *Preparación del soporte (scaffold)*

Se preparó una disolución al 20% en peso de policaprolactona (PCL) en dioxano. Se añadió a continuación un 10% en peso (con respecto 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 media hora.

15

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 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.

20

Se cambió el etanol tres veces y se dio la vuelta a 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 secado.

25 2. *Preparación del soporte activado*

25

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.

30

Inmediatamente la estructura se sumergió durante diez segundos en cloruro cálcico de concentración 0,05 mol.L⁻¹, y se aclaró con agua destilada. A continuación se sumergió durante diez segundos en fosfato de potasio 0,05 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.

35

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.

40

Ejemplo 2

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

45

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).

50

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).

55

Se ha comprobado que la concentración de la disolución influye la cantidad y morfología de los microporos, mientras la cantidad de porógeno influye 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.

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

60

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

65

ES 2 331 678 B2

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 hidroxiapatita biomimética durante dos semanas, cambiando el SBF a la semana para suplir la pérdida de especies iónicas en el medio debido a la deposición.

5 Se llevó a cabo un análisis elemental de la superficie de los scaffolds utilizando microscopía 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 hidroxiapatita. Los resultados obtenidos en todas las muestras con diferente composición y tiempo de inmersión en SBF muestran, como se observa en la Figura 7
10 impurezas como magnesio, sodio, y cloruros, que han cristalizado junto al fosfato cálcico; eso es típicamente el caso en la hidroxiapatita del hueso, mientras la hidroxiapatita sintetizada en laboratorio y sinterizada suele estar pura, altamente cristalizada, lo que dificulta su reabsorción una vez implantada.

15 En la microfotografía SEM (Figura 8) se puede observar un scaffold de policaprolactona recubierta de hidroxiapatita 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 calentar esta muestra el residuo mantiene su integridad física, prueba de que las dos fases están altamente interpenetradas y interconectadas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un soporte tridimensional que consiste en una matriz de policaprolactona que comprende partículas de tamaño nanométrico o micrométrico de un material inorgánico dispersas y homogéneamente distribuidas en dicha matriz de policaprolactona 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.
- 10 2. Soporte según la reivindicación 1, que presenta una porosidad en volumen comprendida entre un 50 y 95% y un módulo elástico comprendido entre 0,1 MPa y 100 MPa.
- 15 3. Soporte según la reivindicación 1 o 2, en el que las partículas de tamaño nanométrico o micrométrico son de hidroxiapatita, fluorohidroxiapatita, disilicio de calcio, fosfato cálcico y sus mezclas.
- 20 4. Soporte según la reivindicación 3, en el que las partículas presentan un tamaño comprendido entre 50-300 nm.
5. Soporte según la reivindicación 4, en el que las partículas presentan un tamaño inferior a 100 nm.
- 25 6. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además en las superficies de los microporos y macroporos núcleos inductores de la cristalización de hidroxiapatita.
7. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un recubrimiento continuo y homogéneo de hidroxiapatita biomimética en la superficie de los macroporos y microporos.
- 30 8. Un procedimiento para obtener un soporte según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las etapas de:
- 35 (i) poner en contacto en un molde una disolución de polímero en un primer disolvente y partículas de refuerzo de tamaño nanométrico o micrométrico de un material inorgánico y agitar la mezcla por ultrasonidos;
- 40 (ii) añadir partículas de porógeno de un tamaño comprendido entre 50 y 1000 μm y homogenizar la mezcla resultante;
- (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;
- 45 (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.
- 50 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la disolución de polímero presenta una concentración comprendida entre 10% al 40% en peso de polímero con respecto al peso total de la disolución.
10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el disolvente se selecciona de entre dimetilsulfóxido, cloruro de metíleno, acetato de etilo, cloroformo, n-heptano, n-hexano, n-pentano, dioxano, benceno, xileno, acetona, naftaleno y sus mezclas.
- 55 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el disolvente es dioxano.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicación 9 o 10, en el que la disolución de polímero se mezcla con las partículas de refuerzo y se homogeneiza con ultrasonidos.
- 60 13. Procedimiento según la reivindicación 8, 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, microfibra poliméricas y sus mezclas.
- 65 14. Procedimiento según la reivindicación 13, 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.
15. Procedimiento según la reivindicación 13 o 14, en el que el tamaño del diámetro de las partículas de porógeno está comprendido entre 100 y 300 μm .

16. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la mezcla homogénea se congela hasta obtener una pieza solidificada.
- 5 17. Procedimiento según la reivindicación 8, 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.
- 10 18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que el segundo disolvente se encuentra a una temperatura de -20°C.
- 10 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que el segundo disolvente se selecciona de entre un disolvente orgánico, un inorgánico y sus mezclas.
- 15 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que el segundo disolvente se selecciona de entre etanol y mezclas de etanol y agua.
- 20 21. Procedimiento según la reivindicación 8, 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.
- 25 22. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el tercer disolvente se selecciona de entre etanol, agua, acetona y sus mezclas.
- 25 23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 22, 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.
- 30 24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que la etapa de tratamiento comprende las siguientes etapas:
- 30 1) tratamiento del soporte por exposición a un plasma de un gas o por inmersión en una disolución de hidróxido sódico.
- 35 2) inmersión del soporte obtenido en 1) alternativamente en soluciones que contienen cada una iones Ca^{2+} o PO_4^{3-} .
- 35 3) inmersión del soporte obtenido en fluido corporal simulado, (SBF).
- 40 25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que el fluido corporal simulado presenta la siguiente composición taponada con ácido clorhídrico y e hidrocloruro de tris (hidroximetil)aminometano (disolución de Kokubo modificada):
- | componente | g/L |
|--------------------------------------|-------|
| NaCl | 136,8 |
| KCl | 3 |
| CaCl ₂ x 6 | 2,5 |
| H ₂ O | 1,5 |
| MgCl ₂ x 6 | 0,5 |
| Na ₂ SO ₄ x 10 | 4,2 |
| H ₂ O | 1 |
| NaHCO ₃ | 3 |
| K ₂ HPO ₄ x 3 | 1 |
| H ₂ O | 1 |
- 45 26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 25, 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.
- 50 27. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la generación o regeneración de tejido.
- 55 28. Empleo del soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la generación o regeneración de tejido *in vitro*.
- 60 29. Empleo según la reivindicación 28, en la que el tejido es conectivo *in vitro*.

ES 2 331 678 B2

30. Empleo según las reivindicaciones 28 o 29 donde el soporte es bioactivo o híbrido *in vitro*.

31. Procedimiento para generar o regenerar tejido que comprende:

- 5 obtener un soporte bioactivo o un soporte híbrido, y
- cultivar *in vitro* en dicho soporte células de un tejido,
- y opcionalmente siembra con células del soporte previo a su cultivo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 331 678 B2

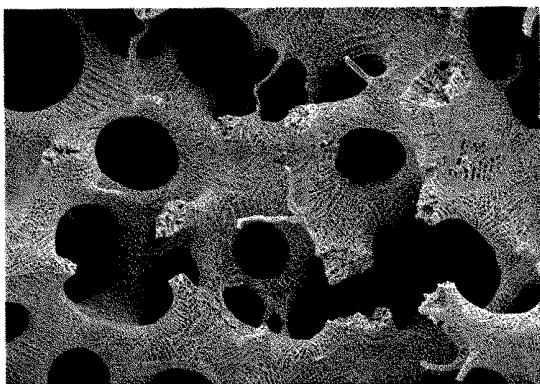


Figura 1 a)

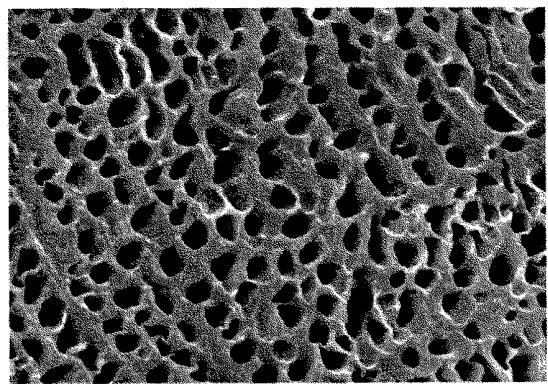


Figura 1 b)

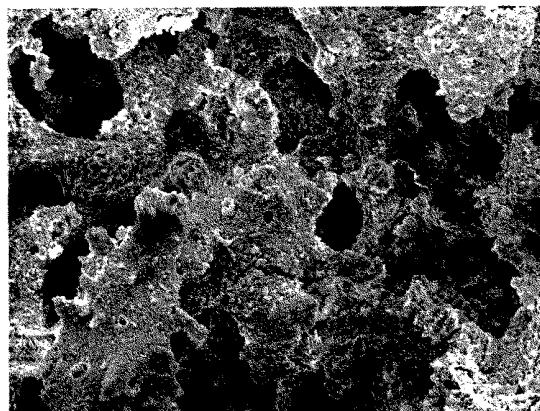


Figura 2 a)

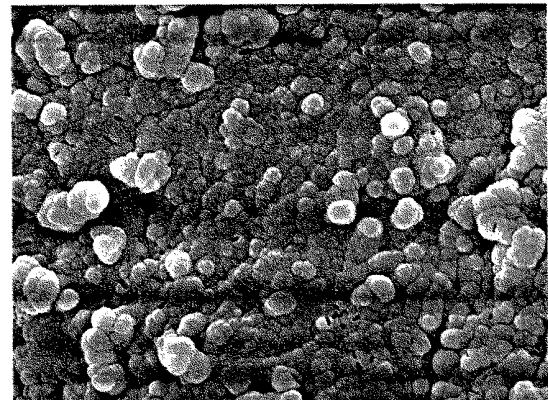


Figura 2 b)

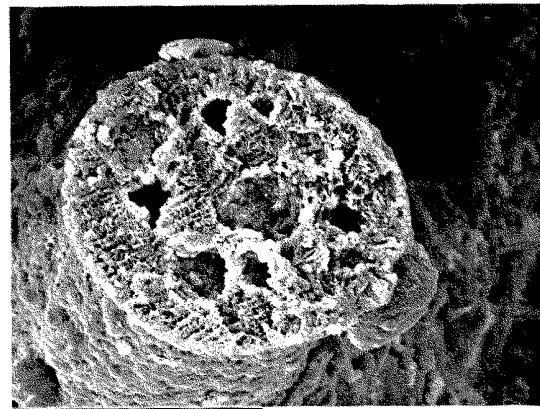


Figura 2 c)

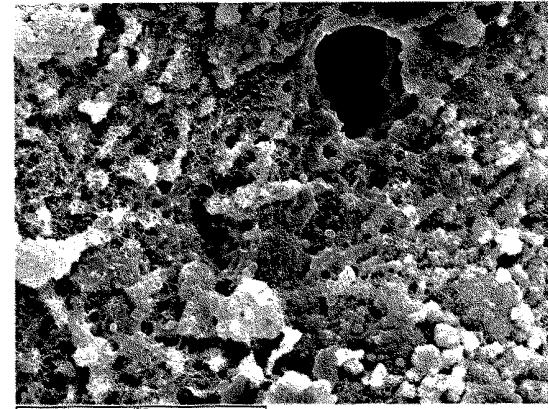


Figura 2 d)

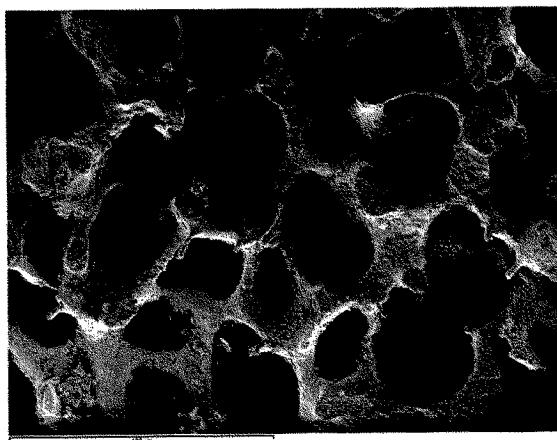


Figura 3

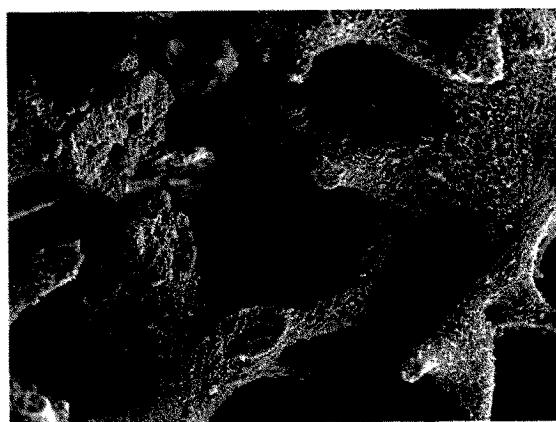


Figura 4

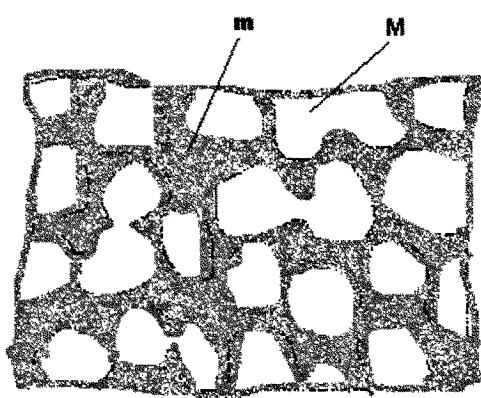
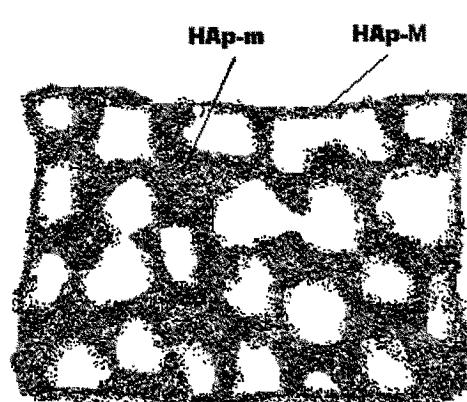


Figura 5: (izq.)



(der.)

ES 2 331 678 B2

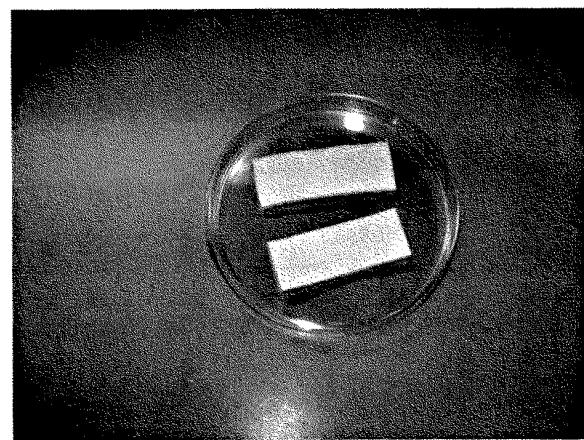


Figura 6

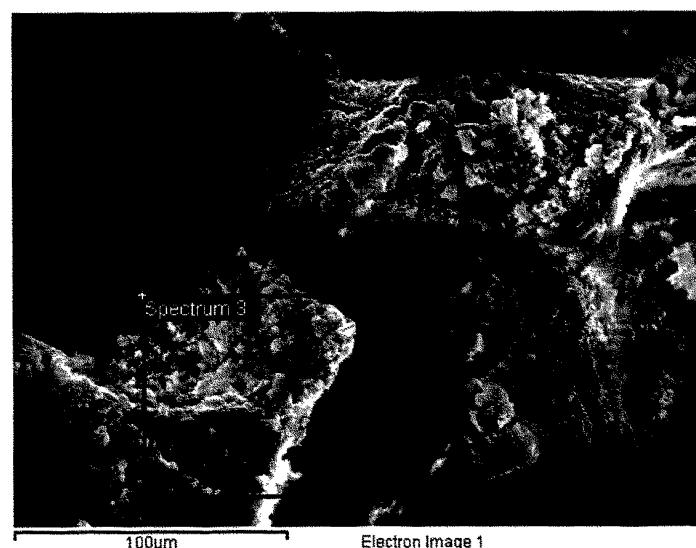


Figura 7

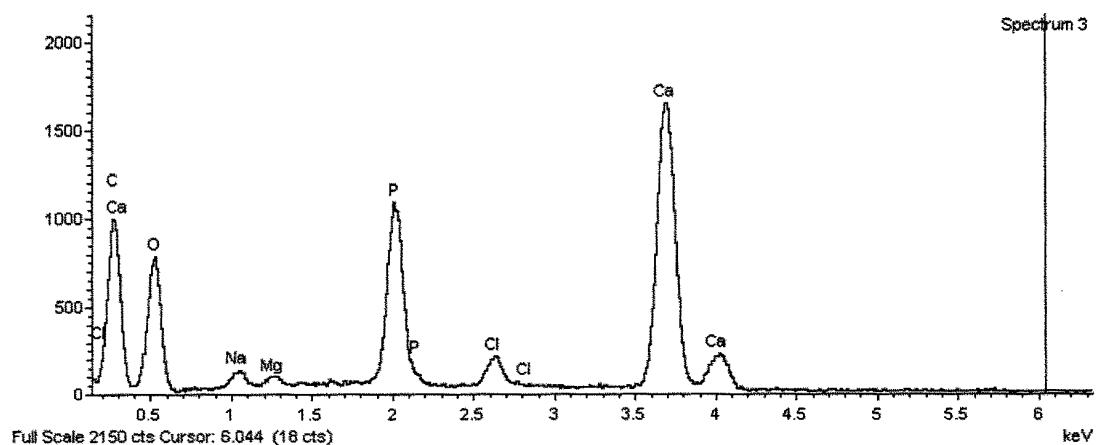


Figura 8



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.: A61L 27/46 (2006.01)
A61L 31/12 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2003082808 A (GUAN et al.) 01.05.2003, párrafos [0009]-[0019],[0052]-[0054],[0060]-[0075], [0081]-[0082]; ejemplos 5,8,10; 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
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

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 21.12.2009	Examinador N. Vera Gutiérrez	Página 1/4
--	---------------------------------	---------------

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 200800390

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

A61L

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, CAS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200800390

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.12.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	12-31	SÍ
	Reivindicaciones	1-11, 32-37	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	12-31	SÍ
	Reivindicaciones	1-11, 32-37	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	US 2003082808 A	01-05-2003
D02	US 5626861 A	06-05-1997
D03	Journal of Biomedical Materials Research, Part A, (2006), 76(1)	2006
D04	US 5338772 A	16-08-1994

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

La solicitud se refiere a 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. Asimismo se refiere al procedimiento de preparación de dicho soporte y al empleo del mismo para la generación o regeneración de tejidos.

En el documento D01 se describe un soporte polimérico macroporoso que incluye partículas de fosfato de calcio de tamaño inferior a 45 micras. Presenta una red de macroporos con un diámetro entre 0,5 y 3,5 mm, con interconexiones macro y microporosas que le confieren un alto grado de interconexión, con una porosidad de al menos 50%. En el ejemplo 10 se prepara un scaffold de material compuesto biodegradable mediante un procedimiento que incluye el recubrimiento de partículas de fosfato de calcio con un agente ligante, la mezcla de estas partículas con una solución de PLGA en dimetilsulfóxido, la adición de glucosa como agente porógeno, el enfriamiento de la mezcla para obtener una pieza solidificada y la inmersión posterior de la misma en agua para eliminar el agente porógeno. El dispositivo se emplea en el campo de la ingeniería tisular como soporte para el crecimiento de células in vivo e in vitro. En el ejemplo 5 se describen algunos tratamientos para la modificación de la superficie del soporte; entre ellos, la deposición de partículas de fosfato de calcio o la deposición por plasma.

El documento D02 se refiere a la fabricación de matrices poliméricas macroporosas formadas por un polímero biodegradable y partículas de hidroxiapatita de tamaño entre 10 y 100 micras. Presentan macro y microporos de diámetro 100 micras y 20 micras respectivamente y una porosidad superior al 90%. En los ejemplos de preparación del material compuesto se suspenden partículas de hidroxiapatita y cristales de cloruro de sodio en una solución de PLGA en cloroformo y a esta suspensión se añade una solución de alcohol de polivinilo. Después del secado y desmoldado, el material se sumerge en agua desionizada para eliminar los cristales de cloruro de sodio. Estas matrices poliméricas son útiles como materiales para la regeneración o reparación ósea, pudiendo ser sembradas con células como osteoblastos u osteoclastos.

El documento D03 divulga materiales compuestos constituidos por policaprolactona e hidroxiapatita para ser empleados en ingeniería tisular. Para la preparación de los mismos se añaden partículas de hidroxiapatita de tamaño entre 0,42 y 11,91 micras a una solución de policaprolactona en N-N-dimetilacetamida, disolvente que será eliminado posteriormente por inmersión de la muestra en etanol.

En el documento D04 se describe un material para implante que contiene un polímero bioabsorbible y partículas cerámicas de fosfato de calcio en una proporción de al menos un 50%. Las partículas se unen por puentes poliméricos para proporcionar una estructura tridimensional con poros abiertos en los que no más de un 50% de las partículas están recubiertas con el polímero. Esta alta proporción de superficie libre permite una mayor regeneración ósea (columna 3, líneas 13-30). Las partículas de fosfato de calcio son preferentemente de hidroxiapatita y entre los polímeros empleados figuran los derivados de láctico-glicólico. Los materiales presentan microporos y/o macroporos, con una porosidad en volumen de hasta un 90% (columna 4, línea 3 - columna 5, línea 4).

Por tanto, a la vista de los documentos D01-D04, se considera que la invención recogida en las reivindicaciones 1-11 y 32-37 de la solicitud no es nueva (Artículo 6.1 L.P.).

No se han encontrado documentos que divulguen un procedimiento de preparación de soportes tridimensionales poliméricos como el detallado en la solicitud. En consecuencia, las reivindicaciones 12-31 de la solicitud son nuevas e implican actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 L.P.).