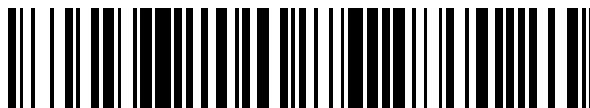


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 105**

21 Número de solicitud: 201400570

51 Int. Cl.:

A61L 27/00 (2006.01)

C03C 3/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

10.07.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.02.2016

Fecha de la concesión:

15.11.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

22.11.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070535

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (33.3%)

Avda Cervantes, 2

29071 Málaga (Málaga) ES;

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES

CIENTÍFICAS (33.3%) y

CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN

RED (CIBER) (33.3%)

72 Inventor/es:

ORGAZ ORGAZ, Felipe;

SANTOS RUIZ, Leonor;

BARBA MARTÍN-SONSECA, María Flora;

BECERRA RATIA, José y

AMAT TRUJILLO, Daniel

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Vidrios y andamiajes bioactivos, procedimientos de preparación y usos de los mismos**

57 Resumen:

Vidrios y andamiajes bioactivos, procedimientos de preparación y usos de los mismos.

Son objeto de la invención vidrios bioactivos, y sus usos, que comprenden óxido de boro y que presentan una sustitución de enlaces B-O en la estructura debida a la formación de enlaces B-N originada por nitruración. Preferentemente, dichos vidrios comprenden adicionalmente otros óxidos, tales como los incluidos, y así preferentemente ordenados conforme a su porcentaje molar y de mayor a menor, en la secuencia $\text{SiO}_2 > \text{CaO} > \text{Na}_2\text{O} > \text{K}_2\text{O} > \text{B}_2\text{O}_3 > \text{P}_2\text{O}_5$. La presente invención también se refiere a procedimientos de obtención de vidrios bioactivos nitrurados que comprenden la mezcla de polvos vítreos que comprenden óxido de boro y, en su caso, óxidos adicionales, y la nitruración de dicha mezcla. Asimismo, son objeto de la invención andamiajes nitrurados que comprenden dichos vidrios bioactivos, procedimientos de preparación de los mismos, y aplicaciones de los mismos.

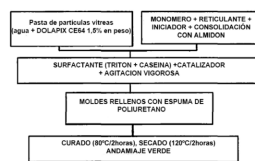


FIG.1

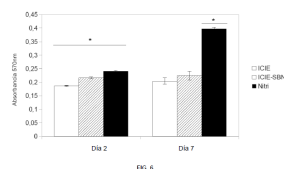


FIG. 4

ES 2 559 105 B1

Vidrios y andamiajes bioactivos, procedimientos de preparación y usos de los mismos

DESCRIPCION

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere en general a materiales bioactivos para ser usados en tecnologías biomédicas para la regeneración e ingeniería tisular. En particular, esta invención se refiere a vidrios bioactivos y a redes tridimensionales o andamiajes ("scaffolds") de vidrio bioactivo. Además, la invención se refiere a métodos de preparación y a usos de los mismos.

ESTADO DE LA TECNICA

Los materiales bioactivos juegan un papel crucial en el desarrollo de la tecnología biomédica para la regeneración e ingeniería tisular. Un aumento de la demanda clínica sobre la ingeniería tisular ósea ha hecho avanzar el esfuerzo en investigación para mejorar la bioactividad de los materiales empleados como sustitutos óseos. La ingeniería tisular para la medicina regenerativa es el proceso por el cual se producen tejidos tridimensionales funcionales combinando andamiajes temporales de biomateriales que tienen una arquitectura bien definida y que actúan como transportadores de células y de factores de crecimiento (u otras biomoléculas de señalización), los cuales facilitan el crecimiento y la diferenciación celulares, y promueven la regeneración tisular.

Los andamiajes de biomaterial, cuando se funcionalizan con éxito, no sólo actúan como un soporte mecánico pasivo para las células óseas, sino que también influyen positivamente en la formación de hueso mediante la estimulación de la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas, y la estimulación del crecimiento óseo vascularizado. Un objetivo importante de la medicina regenerativa es restaurar la función del tejido con estructuras implantables, cultivadas en laboratorio, las cuales contienen las células específicas de cada tejido que replicarán la función de las células del tejido nativo sano. La comprensión de los mecanismos biológicos de osificación "in vitro" puede contribuir al diseño de materiales específicos que apoyen dicho proceso de osificación, y con ello al diseño de implantes ingenierizados más exitosos. Los desafíos más importantes en el campo de las estructuras de ingeniería tisular consisten en imitar tanto la microarquitectura de los tejidos como el microambiente que

rodea a las células in vivo. Para ello es necesario capturar la complejidad del hueso y reproducirla en modelos tridimensionales “in vitro”, a fin de obtener un mayor control sobre la respuesta biológica y conseguir que los biomateriales actúen como guías morfogénéticas.

5

La arquitectura del andamiaje es crítica para proporcionar a las células un microambiente optimizado para la síntesis de tejido nuevo; así como para permitir el flujo y la difusión de nutrientes entre las células y el microambiente circundante. Los andamiajes deben presentar una estructura jerárquica de poros, que comprenda por un lado macroporos interconectados con diámetros superiores a los 100 μm , los cuales son necesarios para favorecer el crecimiento de hueso vascularizado; y por otro lado mesoporos interconectados (2 – 50 nm), que favorecen la adherencia de las células osteoprogenitoras.

10

Obviamente, la respuesta celular depende no solo de la composición química y de la porosidad, sino también de características del andamiaje tales como la rugosidad y topografía superficiales, el tamaño de grano y la cristalinidad, así como de los radicales químicos presentes en su superficie. La capacidad del biomaterial constituyente del andamiaje para promover la adhesión celular y el crecimiento óseo es crítica en ingeniería tisular. Las células deben adherirse y colonizar el sustrato antes de comenzar los procesos de proliferación y diferenciación. Por tanto, la función principal del andamiaje en ingeniería tisular es servir como sustrato para la adhesión celular. Se ha propuesto que las células no se adhieren directamente a los sustratos, sino a componentes presentes en el medio de cultivo celular, o en la matriz extracelular (por ejemplo, proteínas como colágeno y fibronectina), que previamente se adsorben sobre el sustrato y son después reconocidos por receptores específicos de la superficie celular (por ejemplo, las integrinas).

20

25

En consecuencia, la adhesión y el crecimiento celulares sobre un biomaterial que ejerza de sustrato pueden ser mejorados funcionalizando el mismo mediante modificaciones químicas que incrementen la adsorción de proteínas de matriz extracelular sobre su superficie, lo que favorecerá la interacción de las células con dicha superficie mediante procesos mediados por receptores específicos de la membrana celular. Se han empleado diversas técnicas de funcionalización, por ejemplo la silanización de vidrios y superficies cerámicas, o la inmovilización de proteínas y péptidos. Aunque los vidrios y cerámicas bioactivos presentan una excelente osteoconductividad, debido a que pueden depositar hidroxiapatito, material

30

35

con una alta capacidad para enlazar proteínas, la funcionalización de las superficies puede ser necesaria para mantener y reforzar la capacidad de enlazar proteínas en sistemas bioactivos.

- 5 Se han utilizado materiales de diferente naturaleza en ingeniería tisular tales como cerámicas, polímeros, materiales compuestos ("composites") y vidrios. En los últimos años se han publicado varios libros y revisiones bibliográficas. Debido a su semejanza química con la fase inorgánica del hueso, hay algunos materiales que se han investigado con más profundidad en relación a posibles aplicaciones como andamiajes
- 10 óseos: fosfatos de calcio (CaP), hidroxiapatito (HAp) o fosfato tricálcico A o B. Estos materiales son bioactivos, osteoconductivos y pueden unirse directamente al hueso.

- Los vidrios bioactivos basados en silicatos, fosfatos o boratos, representan otro importante grupo de biomateriales inorgánicos bioactivos que pueden ser utilizados
- 15 como sustitutos de hueso o como andamiajes en ingeniería tisular ósea, porque presentan propiedades osteoconductoras y osteointegradoras: capacidad de unirse tanto a tejidos blandos como duros, debido a la formación de una película de un material similar al hueso en su superficie (hidroxiapatito carbonatado). Este material osteosimilar se forma al entrar el material en contacto con fluidos fisiológicos, y es
- 20 resultado de una rápida secuencia de reacciones en la superficie del implante de vidrio bioactivo (Hench LL. *Bioceramics*; J Am Ceram Soc 1998;81(7):1705-28) que incluyen:
- degradación del vidrio,
 - reacción de los iones calcio disueltos fuera del vidrio con el fosfato del medio para precipitar como una capa de fosfato de calcio amorfo (ACP),
 - 25 - liberación iónica continuada y crecimiento de la capa de ACP,
 - conversión final de la capa de ACP en una meso estructura porosa de finos cristales de Hap,
- manteniéndose una interfase estable durante un periodo suficientemente largo como para promover la interacción con colágenos y otras biomoléculas, lo que da lugar en
- 30 última instancia a una fuerte interfase de unión entre el vidrio del implante y los tejidos vivos circundantes.

- La bioactividad del vidrio se mide por la tasa de conversión en HAp. Por otro lado, se ha demostrado explícitamente que los vidrios bioactivos tienen excelentes propiedades
- 35 osteogénicas, gracias a los iones liberados por disolución parcial, principalmente iones calcio y silicio, los cuales se piensa que estimulan la expresión de diversos genes que

promueven la diferenciación y proliferación de células osteoblásticas y el rápido crecimiento del hueso.

5 Hoppe y col. [A. Hoppe, N.S.Güldal and A.R. Bocaccini. *A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics*. Biomaterials. 32 (2011) 2757-2774], han realizado una revisión bibliográfica sobre las respuestas biológicas a los productos iónicos disueltos a partir de vidrios bioactivos y cerámicas vítreas. Estudios previos revelaron que las características del sustrato, tales como la porosidad o los grupos silanoles superficiales, pueden ser cruciales en la
10 formación y degradación de apatito. "Bioglass 4585" (referido frecuentemente como Bioglass®) fue el primer material encontrado que se unía al hueso y ha sido ampliamente estudiado y analizado como referencia. En cirugía ortopédica y en ortodoncia se han utilizado, para reparar defectos óseos, vidrios bioactivos en forma de partículas, en forma de andamios porosos o como estructuras densas. Aún más, se
15 ha descrito que los vidrios bioactivos estimulan la angiogénesis "in vitro" e "in vivo" y también se han descrito posibles efectos antibacterianos y antiinflamatorios.

Otras ventajas de los vidrios bioactivos sobre otros materiales bioactivos son:

- flexibilidad en la composición,
- 20 - facilidad de preparación,
- capacidad de controlar y ajustar la tasa de degradación a la tasa de regeneración ósea, manipulando la composición del material, y
- la capacidad de constituirse en fuente de otros componentes menores que se sabe favorecen el crecimiento del hueso (tales como Zn, Cu, F, Mn, Sr o B), los cuales,
25 liberados a tasas biológicamente aceptables, inducen la mineralización de células osteogénicas.

Por todo ello los vidrios bioactivos son considerados como de gran interés en ingeniería tisular. La disolución iónica de los productos liberados por los vidrios
30 bioactivos estimulan los genes hacía la regeneración y auto-reparación.

El vidrio silicato bioactivo conocido como 45S5, así como otros vidrios bioactivos y cerámicas vítreas basadas en la composición del 45S5, tales como la 13-93 y la ICIE 16, han sido los más investigados para aplicaciones de ingeniería tisular. A partir del
35 45S5 es difícil obtener andamiajes porosos y amorfos, debido a que su estrecho margen de sinterización hace que cristalice formando una cerámica vítrea, lo cual reduce notablemente su bioactividad.

Con el objetivo de ampliar el rango de la sinterización del 45S5, se han desarrollado diferentes composiciones que pueden ser sinterizadas evitando la cristalización y obtener andamiajes de vidrios bioactivos amorfos. Dichas composiciones pueden sinterizarse en materiales de estructura porosa mediante métodos ampliamente utilizados para preparar estructuras porosas interconectadas, tales como el método de infiltración de esponja polimérica, o el colaje de geles ("gel casting").

El vidrio 1393 podía sinterizarse evitando la cristalización. Sin embargo, los andamiaje solo fueron capaces de nuclear apatito en fluido corporal simulado (FCS) tras 7 días de inmersión, con refresco diario del FCS, lo cual es demasiado lento.

Wu y col. (Wu ZY, Hill RG, Yue S, Nightingale D, Lee PD, Jones JR. *Melt-derived bioactive glass scaffolds produced by a gel-cast foaming technique*. Acta Biomaterialia, Vol 7, Issue 4, April 2011, pp.:1807-1816) han desarrollado un andamiaje de vidrio bioactivo poroso obtenido por fusión amorfa, denominado ICIE 16, que presenta una estructura porosa adecuada para el crecimiento de hueso en su interior. La composición del ICIE 16 se diseñó para permitir la sinterización, pero manteniendo una bioactividad similar a la del biovidrio 45S5, gracias a que se mantiene la conectividad de la estructura (entendida como enlaces puente de oxígeno por cada átomo de silicio) lo más cercana posible a 2. Este material tiene la potencialidad de unirse al hueso más rápidamente y de estimular mejor el crecimiento óseo que otros sustitutos óseos porosos artificiales disponibles en el mercado. El tamaño del polvo de vidrio es crítico para la eficacia de la sinterización. También es crucial la temperatura de sinterización, ya que temperaturas por encima de 700 °C disparan la cristalización, mientras que temperaturas por debajo de 680°C no permiten la sinterización completa de las partículas.

Frente a las posibilidades referidas, los vidrios bioactivos basados en silicatos presentan algunos inconvenientes que limitan su empleo en reparación tisular:

- conversión lenta e incompleta a HAp
- ralentización de la degradación del vidrio, debido a la pasivación que ejerce el crecimiento de la capa de apatito, lo que impide la reabsorción completa del material y da lugar a la persistencia del vidrio no convertido "in vivo" y por tanto a una pobre degradación.

Vidrios bioactivos basados en boratos recientemente desarrollados han mostrado una degradación más rápida gracias a su menor durabilidad química y se convierten de forma más completa en HAp, comparados con vidrios bioactivos basados en silicatos. Además presentan tasas de degradación controladas en combinación con propiedades deseables relacionadas con la osteogénesis y la angiogénesis. La conversión del vidrio bioactivo basado en boratos en HAp parece seguir un proceso similar al descrito para el vidrio 45S5, pero evitando la formación de una capa rica en SiO_2 . Estos vidrios presentan una alta potencialidad para ser usados como una nueva clase de biomateriales.

Los vidrios bioactivos basados en boratos han mostrado que favorecen la proliferación y la diferenciación celular “in vitro”, así como la infiltración tisular “in vivo”. Asimismo, pueden servir como sustratos para la liberación de fármacos y para el tratamiento de la infección ósea.

Por otro lado se dispone de evidencia que sugiere que la nitruración de vidrios de silicatos, fosfatos y boratos, altera sus propiedades físicas y químicas tanto internas como de la superficie. La presencia de nitrógeno disuelto químicamente en una estructura vítrea que contiene óxidos, da lugar a la formación de oxinitruros que mejoran algunas propiedades físicas tales como la dureza o el módulo elástico de resistencia a la fractura. Esto significa que el reemplazo de oxígenos por nitrógenos supone un reforzamiento de la estructura vítrea como consecuencia de la sustitución de átomos de oxígeno con n° de coordinación 2, por átomos de nitrógeno con n° de coordinación 3. La duración química, así como las propiedades mecánicas y eléctricas de los vidrios de fosfato pueden mejorarse considerablemente incorporando nitrógeno en una atmósfera de NH_3 . Se cree que el nitrógeno reemplaza a los hidroxilos ($-\text{OH}$) terminales y los átomos de oxígeno enlazantes ($-\text{O}-$) y no enlazantes ($=\text{O}$) del tetraedro de PO_4 , dando lugar a la formación de enlaces $-\text{NH}<$ y $-\text{N}=$ que incrementan el reticulado de la estructura vítrea. La intensidad de la banda de absorción IR a 480 cm^{-1} , que es la característica de la vibración del enlace P-N, aumenta al crecer en contenido de nitrógeno en el vidrio de base. Estudios de nitruración de vidrios basados en borato han mostrado que pueden nitrurarse de forma similar. Al analizarse los espectros de transmisión infrarroja aparece que el estiramiento más fuerte de B-N se mide a 1390 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} para BN_3 triangular y BN_4 tetragonal. Se ha encontrado que el nitruro de boro amorfo consiste casi exclusivamente en unidades triangulares planares de BN_3 . Los mecanismos de incorporación de nitrógeno en vidrios de boratos o borosilicatos alcalinos, indican un equilibrio dinámico entre las

formas $-NH_2$, $-NH$ y $-N=$ que se desplaza dependiendo de los diferentes rangos de temperatura y también de la composición del material. Se cree que el amoníaco reacciona con los grupos BOH y $SiOH$ y el agua generada rompe los enlaces $B-O-B$ y $B-O-Si$ para dar lugar a la formación de hidroxilos BOH y $SiOH$. En vidrios $SiO_2-B_2O_3-Na_2O$ con contenidos de B_2O_3 inferiores al 30% molar, los grupos $-NH_2$ prevalecen a temperaturas entre 400 y 500 °C. los grupos $-NH$ prevalecen a temperaturas entre 400 y 600 °C y los $-N=$ a temperaturas superiores a 800°C.

La formación de nitruro de boro se incrementa en presencia de $Li > Na > K$ y también al aumentar la temperatura del tratamiento con flujo de amoníaco gaseoso. A bajas temperaturas, los grupos más frecuentes fueron los $-NH_2$ y NH .

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Constituye un primer objeto de la presente invención un vidrio bioactivo que comprende óxido de boro y que presenta una sustitución de enlaces $B-O$ en la estructura debida a la formación de enlaces $B-N$ originada por nitruración. Preferentemente, el vidrio bioactivo comprende adicionalmente dióxido de silicio, óxido de calcio, óxido de sodio, óxido de potasio y pentóxido de fósforo. Preferentemente, dichos óxidos comprendidos en la composición del vidrio bioactivo poroso se ordenan, conforme a su porcentaje molar, y de mayor a menor, según la secuencia $SiO_2 > CaO > Na_2O > K_2O > B_2O_3 > P_2O_5$.

En un modo de realización particular el vidrio bioactivo poroso comprende

- 55,27% molar de dióxido de silicio, SiO_2

- 29,02% molar de óxido de calcio, CaO

- 7,30% molar de óxido de sodio, Na_2O

- 5,28% molar de óxido de potasio, K_2O

- 2,27% molar de óxido de boro, B_2O_3

- 0,86% molar de pentóxido de fósforo, P_2O_5

y presenta una sustitución de enlaces $B-O$ en la estructura debida a la formación de enlaces $B-N$ originada por nitruración.

Las composiciones de los vidrios se expresan en porcentajes molares, esto es, fracciones molares (número de moles del componente dividido por el total de moles de todos los componentes en la mezcla) expresadas en porcentaje (porcentaje relativo del número de moles del componente respecto del total de moles de todos los componentes en la mezcla).

Los enlaces B-N se forman en unidades triangulares BN_3 planares, las cuales forman películas de nitruro de boro amorfo en la superficie del vidrio bioactivo.

- 5 Constituye otro objeto de la presente invención un procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso que comprende las siguientes etapas:
- mezcla de polvos vítreos que comprenden óxido de boro, y
 - nitruración por contacto con un flujo gaseoso que comprende amoníaco, NH_3

- 10 Preferentemente los polvos vítreos a mezclar comprenden adicionalmente dióxido de silicio, óxido de calcio, óxido de sodio, óxido de potasio y pentóxido de fósforo y más preferentemente dichos óxidos comprendidos en la mezcla de polvos vítreos se ordenan, conforme a su % molar, y de mayor a menor, según la secuencia $\text{SiO}_2 > \text{CaO} > \text{Na}_2\text{O} > \text{K}_2\text{O} > \text{B}_2\text{O}_3 > \text{P}_2\text{O}_5$

15

En un modo particular de realización, la mezcla de polvos vítreos comprende:

- 55,27% molar de dióxido de silicio, SiO_2
- 29,02% molar de óxido de calcio, CaO
- 7,30% molar de óxido de sodio, Na_2O
- 20 - 5,28% molar de óxido de potasio, K_2O
- 2,27% molar de óxido de boro, B_2O_3
- 0,86% molar de pentóxido de fósforo, P_2O_5

- 25 En un modo particular de realización, los polvos vítreos a mezclar se obtienen parcial o totalmente a partir de uno o más vidrios bioactivos preexistentes, comprendiendo la obtención de una mezcla de polvos vítreos a partir de dichos uno o más vidrios preexistentes las siguientes etapas:

- fusión de dichos uno o más vidrios preexistentes,
- enfriamiento de dichos uno o más vidrios preexistentes fundidos,
- 30 - secado de dichos uno o más vidrios preexistentes tras la etapa anterior, y
- molienda y tamizado de dichos uno o más vidrios preexistentes tras la etapa anterior.

- 35 En un modo más particular de realización, los polvos vítreos obtenidos a partir de uno o más vidrios bioactivos preexistentes se mezclan entre sí, y/o con otros polvos vítreos, en la proporción deseada para, tras la etapa de nitruración, obtener un vidrio bioactivo poroso.

En un modo aún más particular de realización, los polvos vítreos se obtienen a partir de dos vidrios bioactivos preexistentes.

Constituye un modo preferente de realización de la presente invención un procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso que comprende las siguientes etapas:

- fusión de un primer vidrio bioactivo que comprende SiO_2 , CaO , K_2O , Na_2O y P_2O_5 .
- fusión de un segundo vidrio bioactivo que comprende SiO_2 , B_2O_3 y Na_2O .
- enfriamiento de ambos vidrios fundidos
- secado de los vidrios tras la etapa anterior
- molienda y tamizado de los vidrios secados procedentes de la etapa anterior
- mezcla de los polvos vítreos procedentes de la etapa anterior en proporciones adecuadas
- nitruración por contacto con un flujo gaseoso que comprende amoníaco, NH_3

Preferentemente, el primer vidrio bioactivo es vidrio ICIE16, el segundo vidrio bioactivo es un vidrio borosilicato (BSG) y la mezcla de los polvos vítreos resultantes se efectúa en una proporción de 80% en peso del primer vidrio bioactivo con 20% en peso del segundo vidrio bioactivo.

En un modo de realización particular del referido procedimiento:

- la fusión del primer vidrio bioactivo tiene lugar a 1420°C durante 1,5 horas
- la fusión del segundo vidrio bioactivo tiene lugar a 1550°C durante 2 horas
- el enfriamiento rápido de los vidrios fundido se hace en agua a temperatura ambiente
- la etapa de secado se desarrolla a 110°C durante 12 horas
- la molienda se hace en molino de atrición y en el tamizado se seleccionan los tamaños inferiores a 5 - 10 μm ,
- la mezcla de los polvos vítreos se hace en seco
- la nitruración se efectúa por contacto con flujo de NH_3 a temperaturas comprendidas entre 400°C y 800°C .

En un modo de realización más particular del referido procedimiento, en el tamizado se seleccionan los tamaños comprendidos entre 5 μm y 10 μm .

En un modo de realización aún más particular del referido procedimiento, en el tamizado se seleccionan los tamaños inferiores a 5 μm .

La presente invención también se extiende a vidrios bioactivos porosos obtenidos mediante el procedimiento objeto de la invención, incluidas las variantes y realizaciones particulares de dicho procedimiento.

- 5 Otro objeto de la presente invención es la utilización de los vidrios bioactivos porosos también objeto de la invención, o de los vidrios bioactivos obtenidos por el procedimiento (incluidas sus variantes y realizaciones particulares) también objeto de la invención, en la preparación de andamiajes para ingeniería tisular.
- 10 Preferentemente, el vidrio comprende óxido de boro y presenta una sustitución de enlaces B-O en la estructura debida a la formación de enlaces B-N originada por nitruración.

En una forma de realización particular, el vidrio bioactivo está formado por:

- 15 - 55,27% molar de SiO_2
- 29,02% molar de CaO
- 7,30% molar de Na_2O
- 5,28% molar de K_2O
- 2,27% molar de B_2O_3
20 - 0,86% molar de P_2O_5

En otra forma de realización especialmente preferida el vidrio bioactivo está formado por:

- 55,27% molar de SiO_2
25 - 29,02% molar de CaO
- 7,30% molar de Na_2O
- 5,28% molar de K_2O
- 2,27% molar de B_2O_3
- 0,86% molar de P_2O_5
30 y presenta una sustitución de enlaces B-O en la estructura debida a la formación de enlaces B-N originada por nitruración.

- Otro objeto de la presente invención lo constituye un andamiaje para ingeniería tisular que comprende un vidrio bioactivo con óxido de boro y que presenta una sustitución
35 de enlaces B-O en la estructura debida a la formación de enlaces B-N originada por nitruración, o un vidrio bioactivo obtenido mediante el procedimiento objeto de la invención (incluidas sus variantes y realizaciones particulares).

En una forma de realización particular, el vidrio bioactivo del andamiaje está formado por:

- 55,27% molar de SiO_2
- 5 - 29,02% molar de CaO
- 7,30% molar de Na_2O
- 5,28% molar de K_2O
- 2,27% molar de B_2O_3
- 0,86% molar de P_2O_5

10

En otra forma de realización especialmente preferida, el vidrio bioactivo del andamiaje está formado por:

- 55,27% molar de SiO_2
- 29,02% molar de CaO
- 15 - 7,30% molar de Na_2O
- 5,28% molar de K_2O
- 2,27% molar de B_2O_3
- 0,86% molar de P_2O_5

y presenta una sustitución de enlaces B-O en la estructura debida a la formación de
20 enlaces B-N originada por nitruración.

En todas las realizaciones referidas los andamiajes presentan una estructura porosa que comprende:

- poros interconectados con diámetros mínimos superiores a 100 μm que permiten la
25 migración celular, la proliferación y la vascularización.
- microporos con tamaño inferior a 10 μm que aumentan la superficie del andamiaje y permiten el aporte de nutrientes y oxígeno a las células.

Otro objeto de la invención lo constituye el procedimiento de preparación de
30 andamiajes que comprende las siguientes etapas:

- adición de un agente dispersante al 1,5% en peso a agua purificada
- adición progresiva a la solución acuosa resultante de la etapa anterior de:
 - un monómero
 - un agente entrecruzante
 - 35 - iniciador
- adición de un agente porógeno y un surfactante

- adición de un catalizador y de los polvos vítreos correspondientes al vidrio bioactivo utilizado y agitación vigorosa
- vertido de la pasta formada tras las etapas anteriores en moldes rectangulares rellenos de espuma de poliuretano
- 5 - gelificación, curado y secado dando lugar a un material vítreo poroso de color verde.
- posterior sinterización del biovidrio integrado en el andamiaje

En un modo de realización particular del procedimiento de preparación de los andamiajes:

- 10 - el agente dispersante es Dolapix CE64®
- el monómero es metacrilamida, el agente entrecruzante es N,N' metilenbisacrilamida y el iniciador es solución de persulfato amónico
- el agente formador de porosidad es almidón de maíz y el agente surfactante comprende caseína
- 15 - el catalizador es tetrametiletiléndiamida
- el curado tiene lugar a 80°C durante 2 horas y el secado a 120°C durante 12 horas
- la sinterización tiene lugar en dos fases:
 - 5 horas a 550°C
 - calentamiento en rampa durante 20 min hasta alcanzar la temperatura de
- 20 sinterización.

Constituye también un objeto de la presente invención el uso de los andamiajes en ingeniería tisular. Para ello, se procede según las siguientes etapas:

- presentación de los andamiajes con geometría cuboidal de volumen comprendido
- 25 entre 3 y 5 mm³.
- lavado con agua bidestilada durante siete días con cambio diario del agua
- esterilización en autoclave y mantenimiento en condiciones de almacenamiento estéril
- siembra celular sobre los andamiajes
- 30 - cultivo de las células sembradas sobre los andamiajes.

Preferentemente:

- se siembran 8×10^5 células por andamiaje y
- el cultivo se realiza a 37°C y con un 5% de CO₂.
- 35 Por último, constituye también un objeto de la presente invención el uso de los andamiajes en osteoinducción. Para ello, las células se inducen eliminando el medio de cultivo y cultivándolas en medio de diferenciación.

En un posible modo de realización, las células se inducen tras un periodo de cultivo de 4 días. En un modo de realización alternativo, las células se inducen directamente tras la siembra.

5

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Fig. 1: diagrama de flujo del procedimiento para la preparación del andamiaje.

Fig. 2: Espectro de infrarrojos del vidrio ICIE16-SBG tras nitruración en una atmósfera de amoniaco.

10 **Fig. 3:** Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) del andamiaje de ICIE16-SBG resultante del proceso de sinterización a 1025°C durante 20 min. Se ha formado una estructura porosa jerárquica trabecular con tamaños de poro a macro y microescala y con buena interconexión entre ellos.

Fig. 4: tinción Hoechst del núcleo celular

15 **Fig. 5:** imagen de microscopía electrónica de transmisión SEM

Fig. 6: ensayo MTT de estimación de la cantidad de células

Fig. 7: tinción ALP – Hoechst (ALP: Fosfatasa alcalina)

Fig. 8: actividad ALP (ensayo pNPP)

20 **MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION**

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a varias publicaciones. Los contenidos de dichas publicaciones, así como las referencias contenidas en las mismas, se consideran incorporados en la presente solicitud. La terminología empleada se utiliza con el fin de describir modos particulares de realización de la invención y sin carácter
25 limitante.

Diseño y preparación de vidrios bioactivos

Se prepararon andamiajes de vidrios bioactivos a partir de una mezcla de dos tipos de polvos vítreos fundidos:

- 30 - un vidrio ICIE 16 (80%) y
- un vidrio de borosilicato de sodio (20%)

Los compuestos constituyentes de ambos vidrios se pesaron y mezclaron en sus proporciones relativas, se fundieron por separado y luego se mezclaron.

El vidrio bioactivo ICIE16, desarrollado por Wu y col. fue fundido en un crisol de platino a 1420°C durante 1,5 horas a partir de SiO₂ (49,46% molar), CaO (36,27%)
35 molar), Na₂O (6,6% molar), P₂O₅ (1,07% molar) y K₂O (6,6% molar).

El vidrio borosilicato (BSG) con una composición de SiO_2 (78,51% molar), B_2O_3 (11,37% molar), Na_2O (10,12% molar) se fundió a 1550°C durante 2 horas en un horno vertical usando un crisol de platino. Ambos vidrios fueron sometidos a un enfriamiento rápido en agua a temperatura ambiente desde la temperatura de fusión y posteriormente secados a 110°C durante 12 horas, para ser posteriormente molidos en un molino de atrición y tamizados seleccionándose los tamaños entre 5 μm y 10 μm . Se usó un proceso de mezcla en seco para obtener el material compuesto de dos fases vítreas formadas por un 80% en peso de ICIE 16 y un 20% en peso de BSG.

Los vidrios de silicato o de fosfato dan lugar a nitrógeno disuelto en la estructura vítrea (vidrios de oxinitruro) cuando son sometidos a nitruración. Sin embargo, los vidrios de borosilicato se eligieron porque son capaces de llegar a un equilibrio simultáneo entre los grupos NH- , -NH_2 y -N= , con un desplazamiento hacia alguna de las formas según la composición y la temperatura del tratamiento.

Proceso de formación y de caracterización de los andamiajes porosos 3-D

Existe una variedad de diferentes técnicas de fabricación tridimensional que se emplean para producir estructuras vítreas con porosidad jerarquizada, entre otras: infiltración de esponja polimérica ("polymer foam replication"), colaje de geles ("gel casting"), sinterización de partículas de vidrio fundido ("thermal bonding of melt derived particles"), sol-gel ("sol-gel foaming"), electrohilado de soluciones o de fundidos viscosos ("electro-spinning from solution or from viscous melt"), o los métodos de prototipado rápido ("solid free form fabrication") tales como la sinterización láser selectiva ("selective laser sintering"), la fabricación por extrusión congelada ("freeze extrusion fabrication") y el colaje robotizado ("robocasting").

El procedimiento utilizado en este caso para preparar los andamiajes de vidrios bioactivos porosos ha sido una combinación de las técnicas de colaje de geles y de infiltración de esponja polimérica, para partiendo de los polvos vítreos fundidos llegar a la estructura vítrea con la arquitectura y geometría deseada. La estructura fue subsiguientemente sometida a sinterización para unir las partículas en una retícula 3D, mecánicamente fiable y con interconexión entre poros. El diagrama de flujo del proceso de formación del andamiaje/estructura se muestra en la figura 1.

Para la fabricación de los andamiajes/estructuras vítreas se siguió el siguiente proceso secuencial:

1) se añadió el agente dispersante Dolapix CE64 a agua purificada

2) a esta solución acuosa se añadieron progresivamente un monómero (metacrilamida), un agente entrecruzante (N,N' metilenbisacrilamida) y un iniciador (solución de persulfato amónico).

3) a continuación se adicionan un agente porógeno (almidón de maíz) y un agente surfactante que comprende caseína.

4) se añaden un catalizador (tetrametiletiléndiamida, TEMED) y el polvo vítreo, seguido de agitación vigorosa con un agitador Ultra-turrax®.

Finalmente, la pasta formada en etapas anteriores se vierte en moldes rectangulares rellenos de espuma de poliuretano. Tras gelificación, curado (80°C, 2 horas) y secado a 120°C durante 12h se obtiene un material vítreo duro y poroso, de color verde.

Los andamiajes de biovidrio sinterizado con estructura porosa altamente interconectada se obtienen mediante un proceso en dos fases:

- 5 horas a 550°C y

- calentamiento en rampa durante 20 min para alcanzar la temperatura de sinterización.

Los parámetros que se consideran críticos para cumplir con los requerimientos mínimos que permiten el crecimiento tisular en estos andamiajes porosos son la porosidad, el tamaño de poro y la interconectividad de los poros.

Se caracterizó la microestructura de los andamiajes usando microscopia electrónica de barrido (JSM6300, JEOL, Japón). Este aparato estaba equipado para poder realizar espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX).

Funcionalización superficial de los andamiajes porosos por nitruración con gas amoníaco

Los andamiajes preparados según el procedimiento descrito se expusieron a reacción con amoníaco en un horno de tubo de vidrio de sílice mediante contacto con un flujo de N₂/amoníaco a 550°C durante dos horas y con una tasa de calentamiento de 10°C/min. Las muestras nitruradas fueron analizadas mediante reflexión IR. Los espectros de IR fueron obtenidos mediante el método de dilución con BrK usando un Spectrum BX (Perkin-Elmer) en el rango de 1500-1600 cm⁻¹ con una resolución de 1 cm⁻¹. Para ello se mezcla 1 mg de muestra con 300 mg de BrK y se presionan a 5 Tm durante dos minutos. En cada barrido se restan los valores de fondo.

Evaluación “in vitro” de los andamiajes de vidrio bioactivo poroso: cinética de liberación de iones y conversión en hidroxiapatito

Se realizó la evaluación “in vitro” de los andamiajes de vidrio bioactivo mediante:

- 5 a) Inmersión en fluido corporal simulado (SBF) para estudiar las tasas de biodegradación, la liberación de iones y la conversión en hidroxiapatito.
 - b) Cultivo de células osteoblásticas murinas sobre los andamiajes y monitorización de la respuesta celular: adhesión, migración, crecimiento y diferenciación ósea.
- 10 Para evaluar la cinética de degradación, los andamiajes de vidrio poroso se sumergieron en solución de fluido corporal simulado a 37°C durante 200 horas. Se calculó la tasa de degradación o disolución del vidrio midiendo la cantidad de iones liberados y de especies solubles en la solución de fluido corporal simulado y las correspondientes pérdidas de peso, cambios en el pH y concentración iónica de la
- 15 solución en función del tiempo. Para ello, se utilizó espectroscopía de emisión de plasma por acoplamiento inductivo (ICP-OES).

Adicionalmente, la tasa de deposición de la conversión en material tipo HAp fue investigada mediante SEM/EDX tras la inmersión en solución de fluido corporal

20 simulado.

Métodos para evaluar la respuesta celular “in vitro” a los andamiajes de vidrio bioactivo poroso.

Se empleó la línea osteoblástica murina MC3T3 – E1 (111) para evaluar la

25 biocompatibilidad y osteoconductividad de los biovidrios.

Las células de MC3T3 – E1 (subclón-4) adquiridas a la American Type Culture Collection (ATCC) se cultivaron en medio esencial mínimo alfa (alfa-MEM) con ribonucleósidos, desoxiribonucleósidos, piruvato de sodio 1mM y L-glutamina 2mM,

30 pero sin ácido ascórbico (GIBCO). Para favorecer la adhesión y el crecimiento celular, las células fueron cultivadas en medio de crecimiento, consistente en alfa-MEM suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO) y 10% de suero fetal bovino (FBS; PAA). Para estimular la diferenciación ósea, las células se cultivaron en medio de diferenciación, consistente en alfa-MEM

35 suplementado con antibióticos, 2% de FBS, dexametasona 10 nM, β-glicerofosfato 2 nM, L-ascorbato 0,2 mM (todo ello de SIGMA) y 300 ng/mL BMP-2 (de R&D Systems). En todos los casos, el medio fue reemplazado cada 2 días.

Los biovidrios ICIE 16, ICIE16/BSG y ICIE16/BSG-Nitri se presentaron en forma de andamiajes con geometría cuboidal de volumen entre 3 y 5 mm³. Antes de la siembra celular, los biovidrios se lavaron en agua bidestilada durante siete días, con cambio diario del agua. Posteriormente fueron esterilizados en autoclave y mantenidos en condiciones de almacenamiento estéril antes de su utilización en los ensayos celulares.

Seguimiento y toma de imágenes de los andamiajes sembrados con células.

Los andamiajes de los biovidrios ICIE 16, ICIE16/BSG y ICIE16/BSG-Nitri se sembraron con 8×10^5 células por andamiaje y fueron cultivados en placas multipocillo con medio de crecimiento y en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% de CO₂). En los días 1, 2, 3 y 7 tras la siembra, los núcleos celulares fueron teñidos, mediante incubación de las células durante 15 minutos en Hoechst 33342 (SIGMA) disuelto en el medio de cultivo. Los cultivos teñidos fueron observados con una lupa binocular (Nikon AZ -100) bajo luz epifluorescente con un filtro UV-2A. Se capturaron imágenes con una cámara digital (Nikon Digital sight DS-5Mc) operada con software de Nis-Elements. Se usaron tres andamiajes de cada tipo de biovidrio en estos experimentos.

Al séptimo día de cultivo, tras observar y tomar imágenes de las muestras, éstas se fijaron durante 45 min en una solución tamponada con fosfato (PBS) que contenía 1% de paraformaldehído y 3% de glutaraldehído. Las muestras fijadas se lavaron por dos veces en PBS, se deshidrataron mediante incubación secuencial (60 min cada serie) en etanol de 20°, 50°, 70°, 96° y 100°. Las muestras fueron deshidratadas y desecadas mediante método de punto crítico (Bal-tec CPD 030), montadas en soportes de aluminio usando cinta de carbono de doble cara, y recubiertas con una película muy fina de oro (JEOL JCC 1100). Posteriormente, fueron observadas y fotografiadas con un microscopio electrónico de barrido modelo JEOL JSM-840.

Ensayos MTT

La evaluación del crecimiento celular sobre las andamiajes se llevó a cabo mediante un ensayo MTT sobre los andamiajes sembrados a diferentes tiempos tras la siembra. Los andamiajes se sembraron con 5×10^5 células por cada andamiaje y cultivados en placas multipocillo bajo condiciones estándar de cultivo. En los días 2 y 7 tras la siembra, el medio normal de cultivo se reemplazó con 1,2 mL de medio de cultivo que contenía 0,5 mg/mL de MTT. Se incubaron los cultivos con MTT en condiciones de

cultivo estándar (37°C y 5% de CO₂) durante 4 horas. Posteriormente, se añadió 1,2 mL de solución de solubilización (10% SDS en HCl 0,01 M) a los pocillos y se incubó durante 24 h en condiciones de cultivo. Tras evaluar la completa solubilización de los cristales de formazán mediante observación en un microscopio de inversión, se transfirió el medio a placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia espectrofotométrica a 570 nm usando un lector de microplacas (ELISA, longitud de onda de referencia 690 nm). Se representaron los datos gráficamente y se analizaron estadísticamente mediante el software SPSS.

10 **Expresión de fosfatasa alcalina**

Se evaluó la diferenciación ósea en los biovidrios mediante osteoinducción de las células sembradas en los andamiajes, seguido de detección de fosfatasa alcalina.

Se sembraron 10⁵ células en cada andamiaje que se dejaron adherir durante 4 horas en medio de cultivo. A continuación, las células fueron o bien dejadas crecer durante 4 días (osteoinducción indirecta) o bien osteoinducidas directamente tras el periodo de adhesión (osteoinducción directa). En ambos casos, la osteoinducción se realizó eliminando el medio de cultivo y cultivando las muestras en medio de diferenciación durante 4 días. Se usaron tres réplicas para cada condición experimental.

La actividad fosfatasa alcalina se midió mediante el método basado en modificación del sustrato pNPP por parte de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). Brevemente, los biovidrios con células sembradas se lavaron con PBS y se cubrieron con una solución que contenía 1 mg/mL de pNPP, tampón tris 0,2 M y cloruro de magnesio 5 mM. Se incubaron en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 60 min y se detuvo la reacción añadiendo un volumen de NaOH 3 M por cada 3 volúmenes de solución sustrato pNPP. Se trasegó la solución a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 405 nm. Los datos se representaron gráficamente y se analizaron estadísticamente mediante el software SPSS.

Para observar la distribución de las células que expresaban fosfatasa alcalina en los andamiajes se reveló la enzima mediante tinción con “Fast Red Violet LP”/Naftol AS-BI fosfato”. Los andamiajes sembrados con células fueron fijados durante 15 min en una solución de acetona que contenía 3% de formaldehído, ácido cítrico 4,6 mM, citrato de sodio 2,3 mM y cloruro de sodio 3 mM. Se enjuagaron con agua desionizada y se incubaron durante 15 min (protegidos de la luz) en un colorante alcalino recién preparado que contenía 0,1 mg/mL “Fast Red Violet” y 0,1 mg/mL de naftol AS-BI fosfato en tampón AMDP 0,05 M más cloruro sódico 8,5 mM y nitrito de

sodio 2 mM. A continuación, las muestras fueron enjuagadas de nuevo en agua desionizada y los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342 tal y como se ha descrito anteriormente. Las muestras fueron observadas y fotografiadas con un microscopio láser confocal (Leica SP5 II) operado mediante software Leica Las AF.

5

Demostración de la incorporación de grupos funcionales -NH_2 en la superficie de los biovidrios mediante espectroscopia IR

Las modificaciones estructurales inducidas por la introducción de nitrógeno en los vidrios BSG se midieron y analizaron mediante espectroscopia infrarroja. La figura 2 muestra el espectro IR del vidrio ICIE16/BSG tras nitruración en atmósfera de amoníaco. Las bandas principales que aparecen en la figura 2A se atribuyen a los modos vibracionales de las retículas de silicato y borosilicato localizadas en:

10

- 969 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace Si-O

- 913 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace Si-O-B

15

- 739 cm^{-1} correspondiente a la deformación del enlace B-O

- 2350 cm^{-1} correspondiente a la vibración del CO_2 .

La figura 2B muestra los resultados espectrales de baja intensidad en el rango comprendido entre 1300 y 1800 cm^{-1} . Se observan diversos picos. La banda localizada en 1420 cm^{-1} corresponde a los estiramientos asimétricos del borato triangular (B-O), que desciende en los vidrios nitrurados. Al nitrurar, se produce un reajuste continuo de la estructura del borato debido a la formación de enlaces B-N, principalmente en unidades triangulares, en las que el estiramiento más fuerte se mide a 1390 cm^{-1} para grupo BN_3 . Es interesante comprobar que las películas de nitruro de boro amorfo consistían casi exclusivamente en unidades BN_3 triangulares planares. Sin embargo, se hace difícil detectar la existencia de enlaces B-N porque la banda localizada a 1410 cm^{-1} puede explicarse por la suma de las vibraciones del enlace B-O y del B-N, enmascarando la banda B-O y la B-N. Las bandas localizadas a 1695 cm^{-1} y 1517 cm^{-1} , corresponden a los modos vibracionales de estiramiento de los grupos B-

20

25

30

NH_2 . Se observa que estas dos bandas se incrementan cuando los vidrios se nitrurizan. Debido a la baja temperatura de nitruración utilizada, predominan los grupos NH_2 sobre los grupos -NH y los B-N, los cuales requieren de temperaturas más altas para formarse.

35

Caracterización microestructural de los andamiajes 3D

La figura 3 muestra una imagen SEM de la microestructura de un material compuesto ICIE16/BSG sinterizado a $1025^\circ\text{C}/20\text{ min}$, en el cual se ha formado un estructura

porosa jerárquica trabecular con tamaños de poro que van desde macroporos bien conectados a poros en escala micro. Para conseguir la interconectividad de esta estructura jerárquica porosa abierta se utilizó un proceso de fabricación consistente en un protocolo combinado en el cual una plantilla de espuma de poliuretano se coloca en un molde sobre el cual se vierte una suspensión de un gel de moldeo que se deja gelificar. No es posible sugerir un tamaño exacto de poros y de volumen hueco para conseguir una generación óptima de tejido, pero los andamiajes con mejor interconectividad se obtuvieron con diámetros de poro mínimos superiores a los 100 μm , manteniendo al mismo tiempo suficiente estructura amorfa en el vidrio para que se produzca la sinterización. Estos poros interconectados permiten la migración celular, la proliferación y la vascularización. Aún más, se ha demostrado la existencia de microporos (tamaño inferior a 10 micras) en los andamiajes (figuras 3b y 3c). Esta microporosidad es también necesaria para aportar a las células nutrientes y oxígeno en la estructura y contribuye a aumentar la superficie del andamio y por tanto mejora:

- la adsorción de factores que inducen la diferenciación celular
- el intercambio iónico
- la organización de las capas de proteína adsorbida, lo que a su vez determina la respuesta celular específica.

Biodegradabilidad de los andamiajes de biovidrios. Pérdidas de peso, cambios en el pH de la solución de fluido corporal simulado y conversión en hidroxiapatito

La evaluación de la tasa de degradación de los andamiajes y su conversión en material tipo hidroxiapatito se realizó mediante inmersión en solución acuosa de fosfato, tal como fluido corporal simulado a 37°C y medida de la pérdida de peso de los andamiajes y de los cambios en el pH de la solución de fluido corporal con el tiempo.

Biocompatibilidad y osteoconductividad de los andamiajes de vidrio. Adhesión celular, crecimiento y diferenciación.

La figura 4 muestra que la tinción Hoechst de los núcleos celulares revela la presencia de células en los tres vidrios ensayados (ICIE16, ICIE16/BSG y ICIE16/BSG-Nitri). La densidad celular aumentó con el tiempo, de manera que tras siete días de cultivo, la superficie completa de los biovidrios aparecía cubierta por células (figura 4). Esto se confirmó mediante microscopía electrónica de barrido, la cual mostraba que las células presentaban un fenotipo indicador de buena relación con los sustratos, con cuerpos celulares extendidos y abundantes filopodios conectando las células entre sí y con el

sustrato. Es interesante hacer notar que se observó que las células crecían también en los bordes de los poros del biovidrio, como si intentaran rellenarlos (figura 5).

Para comparar cuantitativamente el crecimiento celular en cada uno de los biovidrios, se realizó un ensayo MTT. En los momentos iniciales (2 días tras la siembra) había importantes diferencias entre los tres biovidrios en cuanto a cantidad de células, siendo Nitru el material con más células y ICIE-16 el menos poblado. En etapas posteriores, no se observaban diferencias entre ICIE16 y ICIE16/BSG, pero había una impactante diferencia entre el biovidrio ICIE16/BSG-Nitri comparado con los otros dos (figura 6).

Se evaluó la diferenciación ósea de células osteoblásticas sembradas sobre los biovidrios mediante la detección de la actividad fosfatasa alcalina (ALP). La detección “in situ” de ALP mediante un cromóforo fluorescente de ALP reveló que todas las células cultivadas tanto sobre ICIE16 como sobre ICIE16/BSG-Nitri expresaban ALP tras 4 días de crecimiento y 4 días de osteoinducción química (figura 7). Las células que daban ALP positiva estaban uniformemente distribuidas sobre las superficies en los dos tipos de biovidrios.

Para comparar la diferenciación celular en los diferentes biovidrios, se sembraron tanto ICIE16 como ICIE16/BSG-Nitri con células osteoblásticas y fueron osteoinducidas tras cuatro días de crecimiento. El ensayo pNPP mostró un considerable incremento de la actividad ALP en ambos biovidrios cuando se comparaba con los controles en los que se había efectuado osteoinducción (figura 8a). En cambio, cuando la osteoinducción se efectuó inmediatamente tras la siembra, solo las células sembradas sobre el biovidrio ICIE16/BSG-Nitri mostraron un incremento en la actividad ALP (figura 8b).

Para evaluar la biocompatibilidad y propiedades osteoconductoras del biovidrio ICIE16/BSG-Nitri, se comparó su comportamiento con el del material precursor, ICIE16, en una serie de ensayos “in vitro”.

Los resultados muestran que las células osteoblásticas se adhieren tanto a ICIE16 como a ICIE16/BSG-Nitri. Las células adheridas pueden crecer sobre ambos materiales y poblarlos, e incluso pueden diferenciarse tras una estimulación apropiada. Por tanto, ambos biovidrios son biocompatibles y osteoconductores “in vitro”.

Wu y col. habían postulado que el ICIE16, presenta una buena compatibilidad con el tejido óseo (y por tanto una potencial aplicabilidad en reparación ósea), basándose en la formación de capas de HAp tras inmersión en fluido corporal simulado. En nuestro

5 trabajo se han llevado a cabo ensayos “in vitro” con células osteoblásticas que proporcionan más evidencia de la potente interacción positiva entre ICIE16 y el hueso. Estas propiedades se muestran por primera vez, ya que Wu y col. no realizaron ensayos biológicos.

10 El biovidrio ICIE16/BSG-Nitri ha sido desarrollado para mejorar las propiedades biológicas positivas de ICIE16 y, de hecho, los ensayos celulares han mostrado una mejora en la respuesta sobre ICIE16/BSG-Nitri en comparación con ICIE16. El crecimiento celular es significativamente mayor en los biovidrios ICIE16/BSG-Nitri y la diferenciación celular tiene lugar antes.

15 En ensayos de osteoinducción indirecta, en los cuales las células se osteoinducen después de que tengan tiempo para crecer y poblar el material, la actividad ALP es similar en ICIE16 y en ICIE16/BSG-Nitri. Sin embargo, en ensayos de osteoinducción directa, en los cuales las células son estimuladas directamente tras la adhesión, solo

20 las células sembradas sobre biovidrios ICIE16/BSG-Nitri fueron capaces de responder al estímulo osteogénico. Esto puede ser debido a la mejor adherencia de las células sobre el biovidrio ICIE16/BSG/Nitri, dando lugar a un cultivo confluyente. Se ha descrito que es necesario un cierto grado de confluencia para que las células osteoblásticas se diferencien. Sin embargo, los ensayos MTT realizados y la observación de las células

25 teñidas con Hoechst no mostraron grandes diferencias en la densidad celular en los primeros días. Esto puede deberse a que los grupos NH₂ en la superficie nitrurada interaccionan con las proteínas séricas del medio de cultivo y con las proteínas de la superficie celular creando un ambiente favorable en el cual las células establecen con el sustrato las conexiones necesarias para llevar a cabo su actividad normal.

30 En conclusión, tanto el biovidrio ICIE16 como el ICIE16/BSG/Nitri se pueden considerar biocompatibles y osteoconductores, siendo el ICIE16/BSG/Nitri el más favorable a la diferenciación osteoblástica.

REIVINDICACIONES

1.- Vidrio bioactivo poroso que comprende óxido de boro, caracterizado por que presenta una sustitución de enlaces B-O en la estructura debida a la formación de enlaces B-N originada por nitruración.

2.- Vidrio bioactivo poroso según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende adicionalmente dióxido de silicio, óxido de calcio, óxido de sodio, óxido de potasio y pentóxido de fósforo.

3.- Vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior caracterizado por que dichos óxidos comprendidos en la composición del vidrio bioactivo poroso se ordenan, conforme a su % molar, y de mayor a menor, según la secuencia $\text{SiO}_2 > \text{CaO} > \text{Na}_2\text{O} > \text{K}_2\text{O} > \text{B}_2\text{O}_3 > \text{P}_2\text{O}_5$

4.- Vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior caracterizado por que comprende:

- 55,27% molar de dióxido de silicio, SiO_2
- 29,02% molar de óxido de calcio, CaO
- 7,30% molar de óxido de sodio, Na_2O
- 5,28% molar de óxido de potasio, K_2O
- 2,27% molar de óxido de boro, B_2O_3
- 0,86% molar de pentóxido de fósforo, P_2O_5

5.- Vidrio bioactivo poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde los enlaces B-N se forman en unidades triangulares BN_3 planares, las cuales forman películas de nitruro de boro amorfo en la superficie del vidrio bioactivo.

6.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- mezcla de polvos vítreos que comprenden óxido de boro, y
- nitruración por contacto con un flujo gaseoso que comprende NH_3

7.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior caracterizado por que los polvos vítreos a mezclar comprenden

adicionalmente dióxido de silicio, óxido de calcio, óxido de sodio, óxido de potasio y pentóxido de fósforo.

8.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior caracterizado por que dichos óxidos comprendidos en la mezcla de polvos vítreos se ordenan, conforme a su % molar, y de mayor a menor, según la secuencia $\text{SiO}_2 > \text{CaO} > \text{Na}_2\text{O} > \text{K}_2\text{O} > \text{B}_2\text{O}_3 > \text{P}_2\text{O}_5$

9.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior caracterizado por que la mezcla de polvos vítreos comprende:

- 55,27% molar de dióxido de silicio, SiO_2
- 29,02% molar de óxido de calcio, CaO
- 7,30% molar de óxido de sodio, Na_2O
- 5,28% molar de óxido de potasio, K_2O
- 2,27% molar de óxido de boro, B_2O_3
- 0,86% molar de pentóxido de fósforo, P_2O_5

10.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 caracterizado por que los polvos vítreos a mezclar se obtienen parcial o totalmente a partir de uno o más vidrios bioactivos preexistentes, comprendiendo la obtención de una mezcla de polvos vítreos a partir de dichos uno o más vidrios preexistentes las siguientes etapas:

- fusión de dichos uno o más vidrios preexistentes,
- enfriamiento de dichos uno o más vidrios preexistentes fundidos,
- secado de dichos uno o más vidrios preexistentes tras la etapa anterior, y
- molienda y tamizado de dichos uno o más vidrios preexistentes tras la etapa anterior.

11.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior caracterizado por que los polvos vítreos obtenidos a partir de uno o más vidrios bioactivos preexistentes se mezclan entre sí, y/o con otros polvos vítreos, en la proporción deseada para, tras la etapa de nitruración, obtener un vidrio bioactivo poroso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

12.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 caracterizado por que los polvos vítreos se obtienen a partir de dos vidrios bioactivos preexistentes.

13.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- fusión de un primer vidrio bioactivo que comprende SiO_2 , CaO , K_2O , Na_2O y P_2O_5 .
- fusión de un segundo vidrio bioactivo que comprende SiO_2 , B_2O_3 y Na_2O .

- 5 - enfriamiento de ambos vidrios fundidos
- secado de los vidrios tras la etapa anterior
- molienda y tamizado de los vidrios secados procedentes de la etapa anterior
- mezcla de los polvos vítreos procedentes de la etapa anterior en las proporciones adecuadas, y
- 10 - nitruración por contacto con un flujo gaseoso que comprende NH_3

14.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior caracterizado por que el primer vidrio bioactivo es vidrio ICIE 16, el segundo vidrio bioactivo es vidrio BSG, y la mezcla de los polvos vítreos resultantes se mezclan en una proporción de 80% en peso del primer vidrio bioactivo con 20% en peso del segundo vidrio bioactivo.

15.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior, donde:

- 20 - la fusión del primer vidrio bioactivo tiene lugar a 1420°C durante 1,5 horas
- la fusión del segundo vidrio bioactivo tiene lugar a 1550°C durante 2 horas
- el enfriamiento de los vidrios fundido se hace en agua a temperatura ambiente
- la etapa de secado se desarrolla 110°C durante 12 horas
- la molienda se hace en molino de atrición y en el tamizado se seleccionan los
- 25 tamaños inferiores a $10\text{ }\mu\text{m}$
- la mezcla de los polvos vítreos se hace en seco
- la nitruración se efectúa por contacto con flujo de NH_3 a temperaturas comprendidas entre 400°C y 800°C .

16.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación anterior, donde se seleccionan los tamaños comprendidos entre 5 y $10\text{ }\mu\text{m}$

17.- Procedimiento de preparación de un vidrio bioactivo poroso según la reivindicación 15, donde se seleccionan los tamaños inferiores a $5\text{ }\mu\text{m}$

18. Vidrio bioactivo poroso obtenido mediante un procedimiento conforme a las reivindicaciones 6 a 17.

19.- Utilización de vidrios bioactivos porosos conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de andamiajes para ingeniería tisular.

20.- Utilización de vidrios bioactivos porosos obtenidos mediante un procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17 en la preparación de andamiajes para ingeniería tisular.

21.- Andamiaje para ingeniería tisular que comprende un vidrio bioactivo poroso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5

22.- Andamiaje para ingeniería tisular que comprende un vidrio bioactivo obtenido mediante un procedimiento conforme a cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17 conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5

23.- Andamiaje según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, caracterizado porque presenta una estructura porosa que comprende:

- poros interconectados con diámetros mínimos superiores a 100 μm que permiten la migración celular, la proliferación y la vascularización.
- microporos con tamaño inferior a 10 μm que aumentan la superficie del andamiaje y permiten el aporte de nutrientes y oxígeno a las células.

24.- Procedimiento de preparación de andamiajes según se definen en las reivindicaciones 21 a 22, que comprende las siguientes etapas:

- adición de un agente dispersante al 1,5% en peso a agua purificada
- adición progresiva a la solución acuosa resultante de la etapa anterior de:
 - un monómero
 - un agente entrecruzante
 - iniciador
- adición de un agente porógeno y un surfactante
- adición de un catalizador y de los polvos vítreos correspondientes al vidrio bioactivo utilizado y agitación vigorosa
- vertido de la pasta formada tras las etapas anteriores en moldes rectangulares rellenos de espuma de poliuretano
- gelificación, curado y secado dando lugar a un material vítreo poroso de color verde.

- posterior sinterización del biovidrio integrado en el andamiaje

25.- Procedimiento de preparación de andamiajes según la reivindicación anterior, donde:

- 5 - el agente dispersante es Dolapix CE64®
- el monómero es metacrilamida, el agente entrecruzante es N,N' metilenbisacrilamida y el iniciador es solución de persulfato amónico
- el agente formador de porosidad es almidón de maíz y el agente surfactante comprende caseína
- 10 - el catalizador es tetrametiletiléndiamida
- el curado tiene lugar a 80°C durante 2 horas y el secado a 120°C durante 12 horas
- la sinterización tiene lugar en dos fases:
 - 5 horas a 550°C
 - calentamiento en rampa durante 20 min hasta alcanzar la temperatura de
- 15 sinterización.

26.- Uso de andamiajes según se definen en las reivindicaciones 21 a 22 en ingeniería tisular.

- 20 **27.-** Uso de andamiajes según la reivindicación anterior, que comprende:
 - presentación de los andamiajes con geometría cuboidal de volumen comprendido entre 3 y 5 mm³.
 - lavado con agua bidestilada durante siete días con cambio diario del agua
 - esterilización en autoclave y mantenimiento en condiciones de almacenamiento
- 25 estéril
- siembra celular sobre los andamiajes
- cultivo de las células sembradas sobre los andamiajes

28.- Uso de andamiajes según la reivindicación anterior, donde:

- 30 - se siembran 8×10^5 células por andamiaje
- el cultivo se realiza a 37°C y con un 5% de CO₂.

29.- Uso de andamiajes según se definen en las reivindicaciones 15 y 16 en osteoinducción.

- 35 **30.-** Uso de andamiajes según la reivindicación anterior, donde las células se inducen eliminando el medio de cultivo y cultivándolas en medio de diferenciación.

31.- Uso de andamiajes según la reivindicación anterior, dónde las células se inducen tras un periodo de cultivo de 4 días.

- 5 **32.-** Uso de andamiajes según la reivindicación 30, dónde las células se inducen directamente tras la siembra.

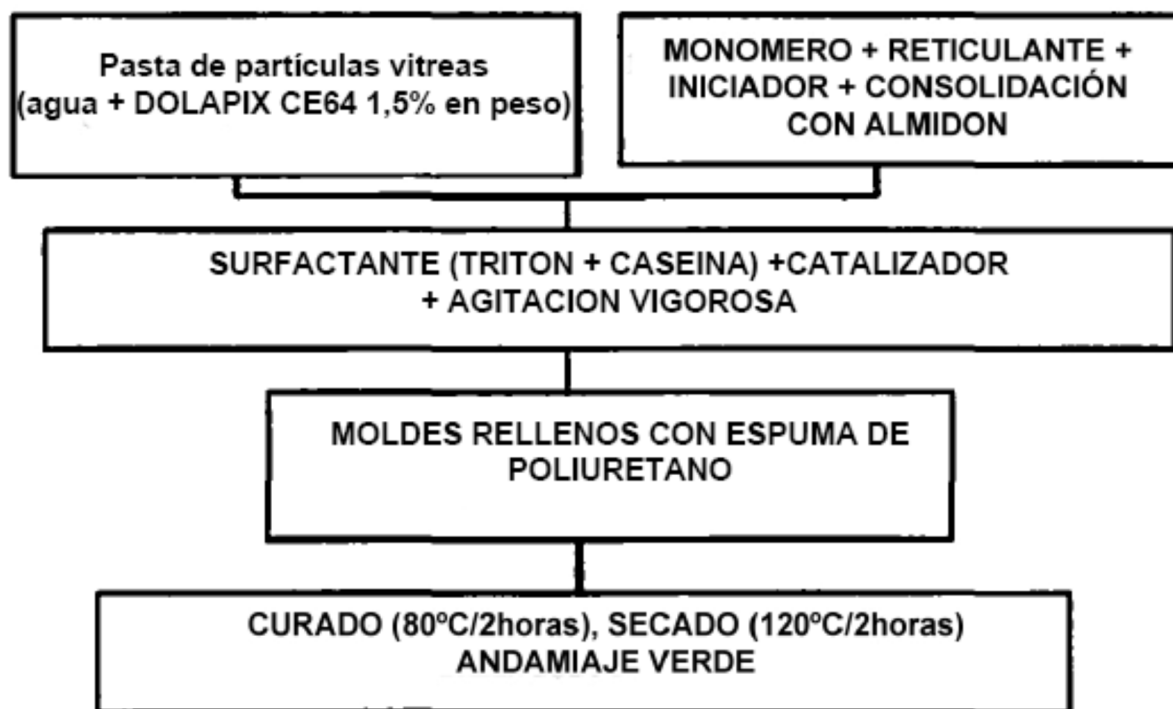


FIG.1

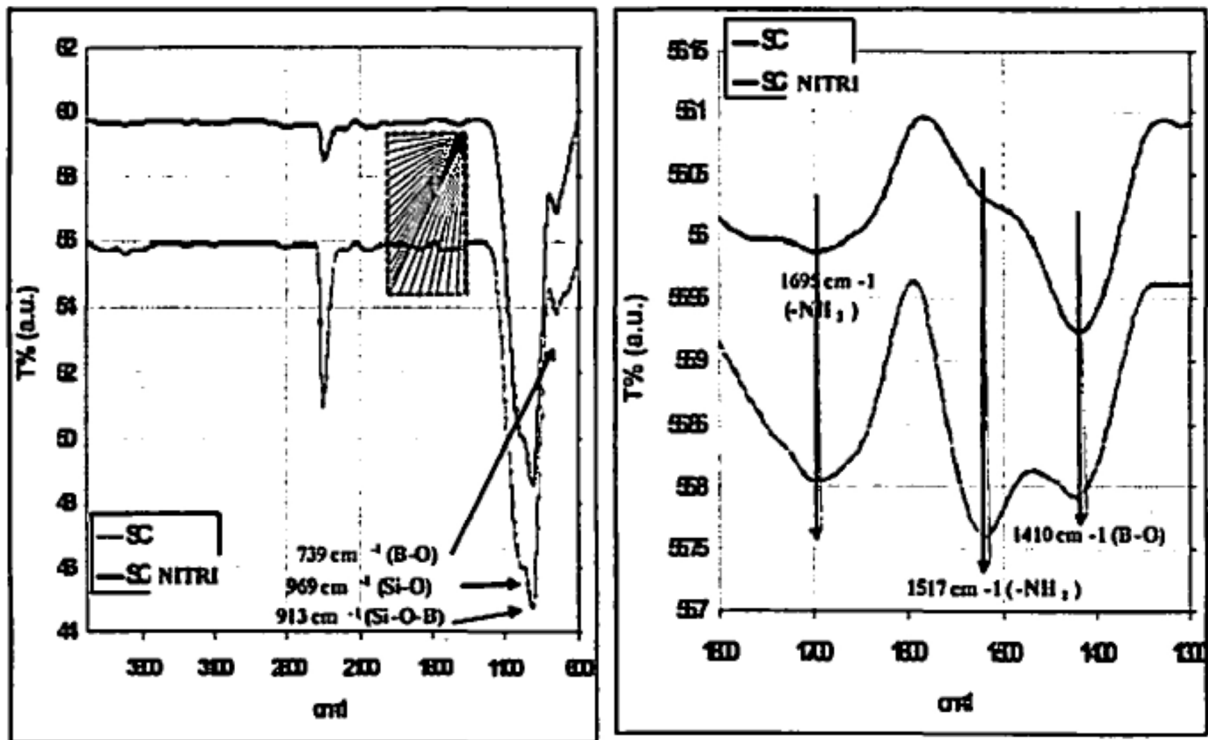


FIG.2

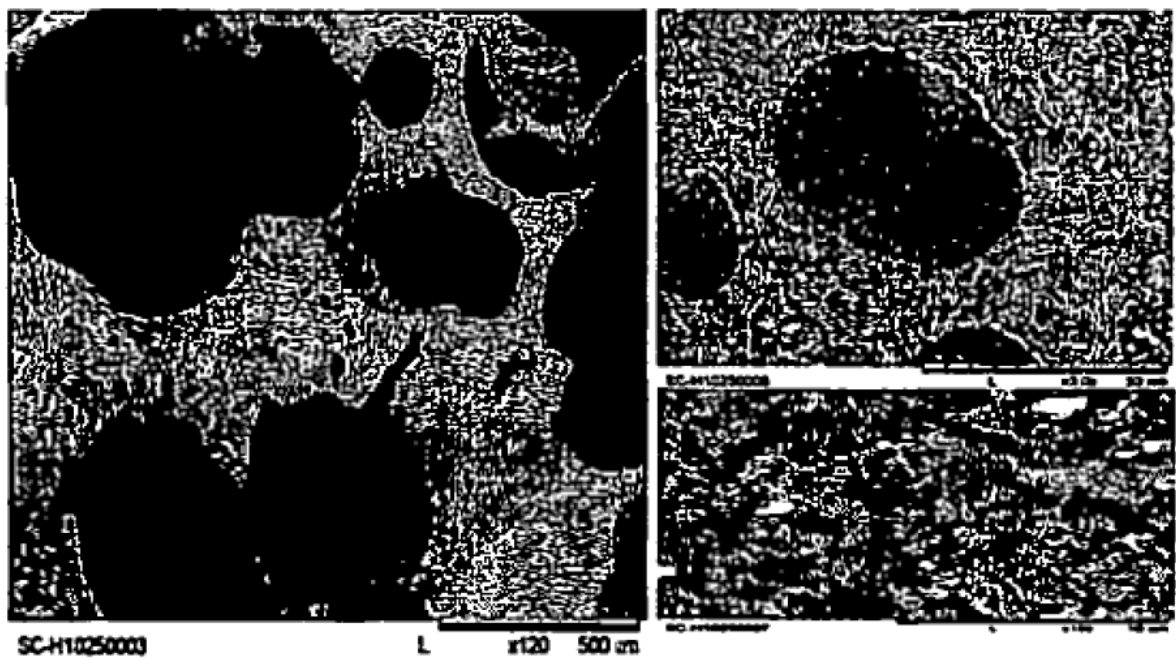


FIG. 3

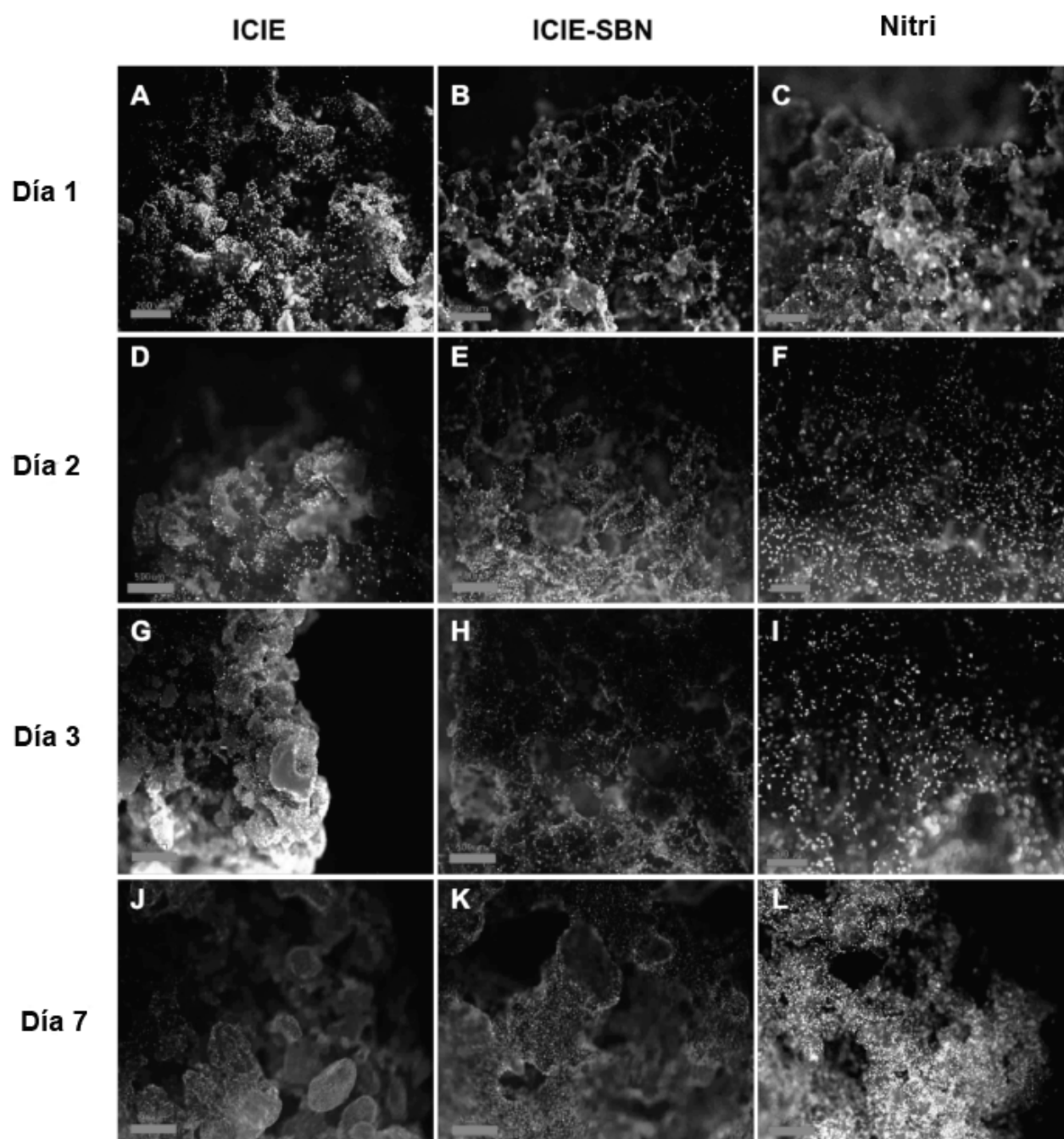


FIG. 4

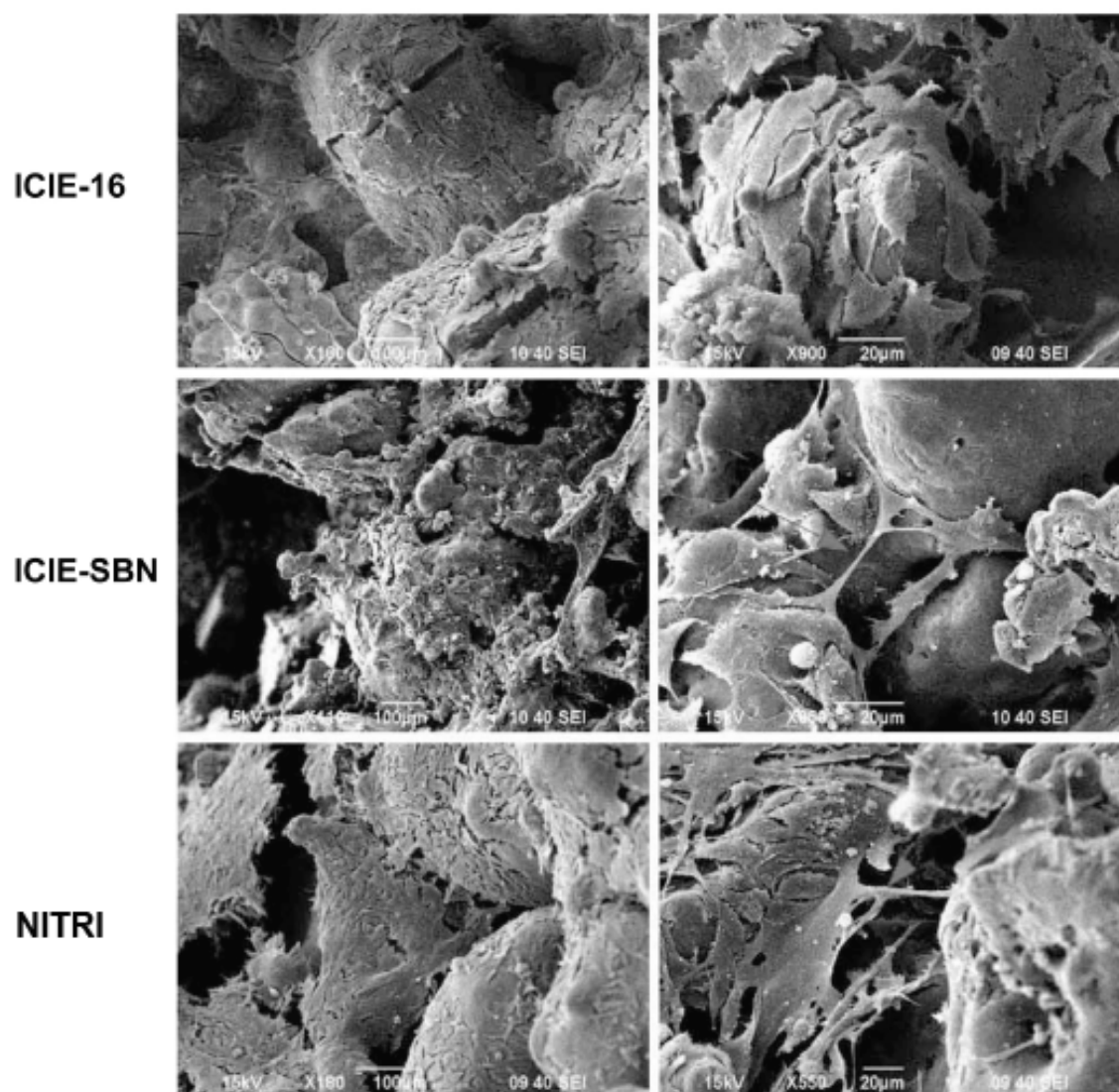


FIG.5

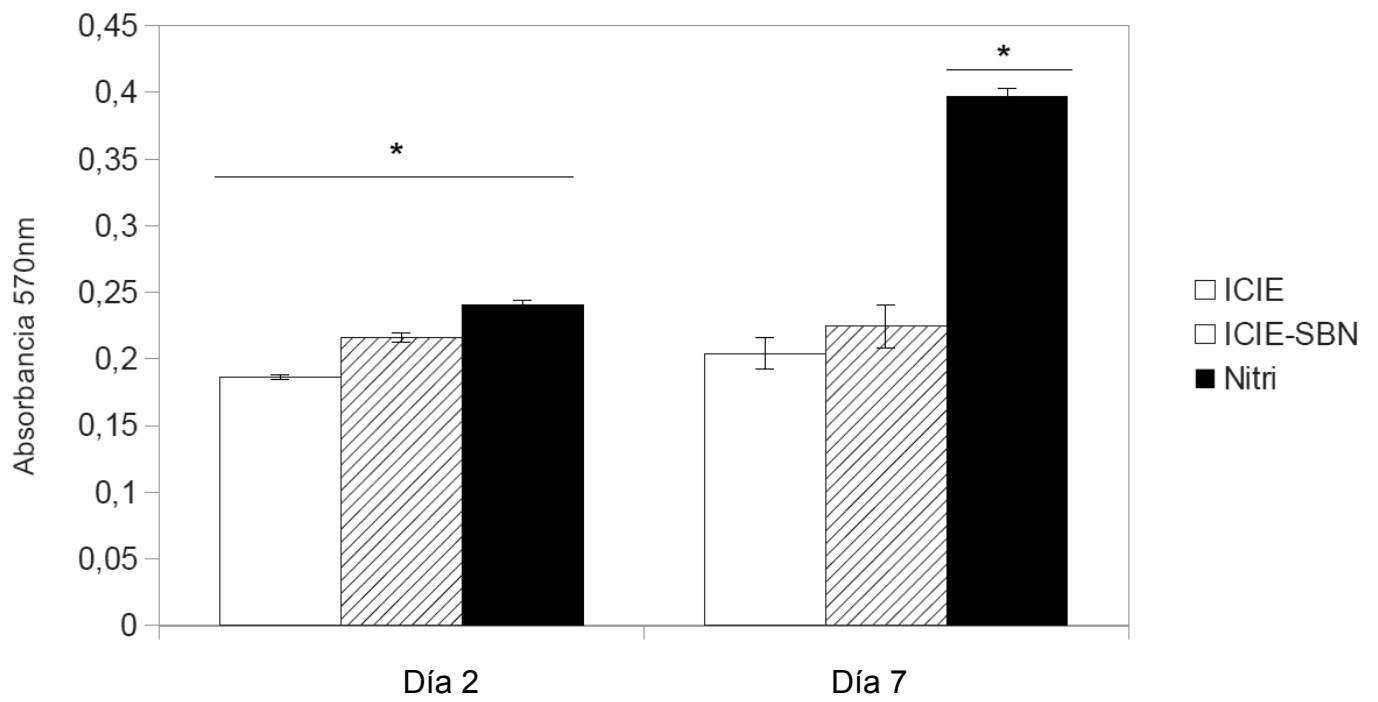


FIG. 6

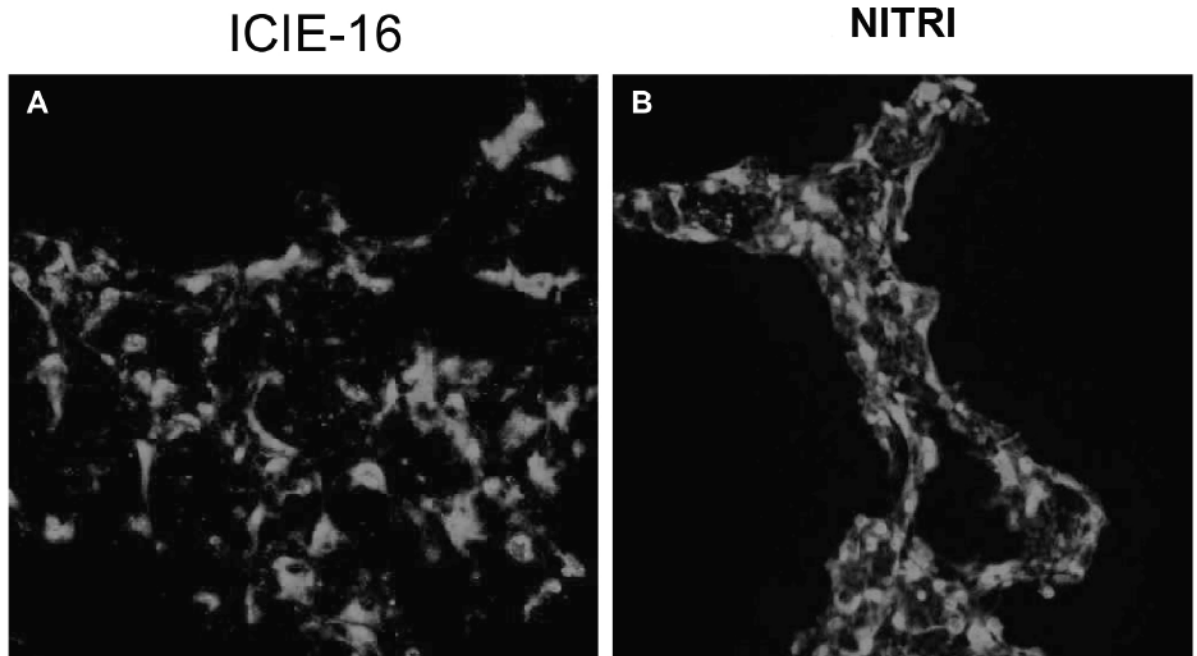


FIG. 7

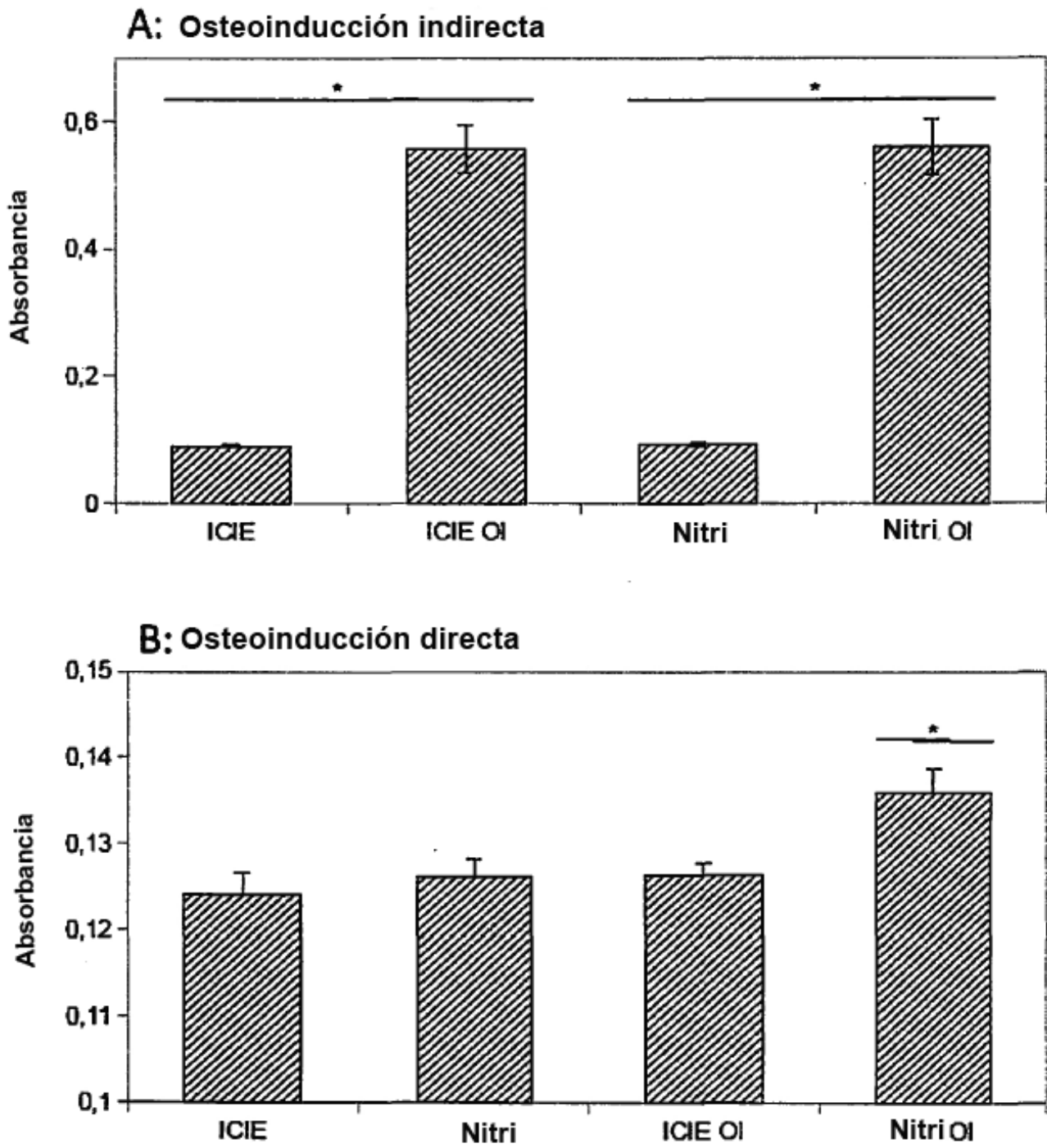


FIG. 8