

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 778**

51 Int. Cl.:

A61L 27/12 (2006.01)

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2010 PCT/EP2010/004548**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11009635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010 E 10740529 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 2456475**

54 Título: **Materiales cerámicos osteoinductivos moldeables e inyectables**

30 Prioridad:
23.07.2009 WO PCT/NL2009/050459

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2021

73 Titular/es:
**NUVASIVE NETHERLANDS B.V. (100.0%)
Jachthavenweg 109 A
1081 KM Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:
**YUAN, HUIPIN;
BARBIERI, DAVIDE;
DE BRUIJN, JOOST DICK;
DE GROOT, FLORENCE y
DAVISON, NOEL**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 804 778 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

5 Materiales cerámicos osteoinductivos moldeables e inyectables

Campo de la invención

10 La invención se refiere a materiales cerámicos bioactivos, en particular, fosfatos de calcio, que demuestran, preferiblemente, propiedades osteoinductivas sobre la base de, entre otras, su microestructura superficial, y, en particular, su microporosidad superficial. Esta clase particular de fosfatos de calcio se denomina en adelante como superficie microestructurada, y, en particular, fosfatos de calcio de superficie microporosa. La invención se refiere, preferiblemente, a materiales cerámicos osteoinductivos, inyectables y/o moldeables.

15 Antecedentes de la invención

20 El desarrollo de materiales cerámicos, que son preferiblemente osteoinductivos, es un avance importante en aquellas áreas de la medicina que abordan el tratamiento de defectos óseos. Esto ayuda a minimizar la necesidad de cosechar hueso autólogo a partir del propio hueso de un paciente, ya que el hueso autólogo que puede cosecharse es escaso. Los materiales osteoinductivos resultan capaces de inducir el desarrollo de nuevo tejido óseo. De manera general, una inducción ósea como tal se define como el mecanismo por medio del cual un tejido mesenquimal se induce para cambiar su estructura celular y convertirse en osteogénico.

25 Una referencia antecedente en cuanto a osteoinductividad que se exhibe por medio de fosfatos de calcio porosos es Yamasaki *et al.* in *Biomaterials* 13:308-312 (1992). Estos materiales pueden caracterizarse como fosfatos de calcio porosos que exhiben microporosidad superficial. Desde entonces, como un avance principal en comparación con los materiales que se divulgan por Yamasaki, los materiales de fosfato de calcio porosos se han vuelto disponibles y muestran propiedades osteoinductivas mejoradas. La superficie microestructurada y, de manera específica, los fosfatos de calcio de superficie microporosa de la presente invención demuestran un rango de tamaño de microporo y gránulo más amplio, así como alta porosidad total.

30 Una referencia representativa en cuanto a fosfatos de calcio de superficie microporosa, osteoinductivos, es US 6,511,510. Otra referencia representativa, dirigida a fosfatos de calcio de superficie microporosa, osteoinductivos, con mejoras adicionales, es WO 2007/94672.

35 Otra mejora en cuanto al tratamiento de defectos óseos reside en la incorporación de materiales que tienen una actividad que contribuyen a la formación ósea, en materiales viscosos, tales como pastas, geles, masillas, o similares. Una referencia antecedente a este respecto es, por ejemplo, WO 2007/068489. Aquí, se emplea un material de pasta para formar, en conjunto con un material poroso sólido en partículas, una matriz que puede usarse para reemplazar o aumentar el hueso. El material poroso sólido en partículas puede ser fosfato de calcio. El resultado es una matriz macroporosa para crecimiento óseo, provista preferiblemente con componentes activos tales como células, factores de crecimiento o agentes de inducción ósea. Otra referencia antecedente en cuanto a formulaciones inyectables para hueso de relleno es WO 2003/028779. Aquí, un relleno óseo que comprende partículas de sales de calcio se proporciona con un aglutinante orgánico y células tales como células madre, células osteogénicas y células osteoprogenitoras. Ninguna de estas referencias se refiere al uso de fosfatos de calcio porosos que son osteoinductivos *per se* y los materiales de fosfato de calcio descritos no presentan la superficie microestructurada que se menciona anteriormente, en particular, el tipo de superficie microporosa. En cambio, si los sistemas descritos en estas referencias fueran usados en la clase de fosfatos de calcio de superficie microporosa osteoinductivos, el material de pasta de WO 2007/068489, el aglutinante de WO 2003/028779, respectivamente, cubrirían la superficie del fosfato de calcio. US 2004/002770 A1 se refiere a un compuesto de polímero-biocerámica que comprende macroporos o microporos, en el que los poros se interconectan de manera opcional, para uso en la reparación de defectos óseos.

45 De manera evidente, la idea de seleccionar una tecnología que cubra una superficie, si la estructura de la superficie del material es esencial para su función prevista, resulta contraria a la propia intuición. El problema que subyace en la presente invención es el desarrollo de materiales, en particular, que comprenden fosfato de calcio, que tienen efectos osteoinductivos y poseen las ventajas de ser moldeables y/o inyectables.

50 Sumario de la invención

60 La presente invención se refiere a un biomaterial que comprende fosfato de calcio poroso, que es preferiblemente osteoinductivo, que tiene una superficie microestructurada y, en particular, una microporosidad superficial, y un vehículo, que es un polímero libre de agua o una mezcla de polímeros libres de agua, que se desintegra en circunstancias fisiológicas, según se define en la reivindicación 1.

65 En otro aspecto, la invención se dirige a un biomaterial que es preferiblemente osteoinductivo, que comprende fosfato de calcio poroso que tiene microporosidad superficial, y un vehículo, en el que el vehículo se desintegra *in vivo*, en un período de tiempo predeterminado para inicio del crecimiento óseo, en particular, en 6 semanas.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un biomaterial, que es preferiblemente osteoinductivo, que comprende fosfato de calcio poroso que tiene microporosidad superficial, y un vehículo, en el que el vehículo tiene preferiblemente un tiempo de disolución de una semana en solución salina fisiológica a 37 °C.

5 En inclusive otro aspecto, la invención se refiere a un biomaterial, que es preferiblemente osteoinductivo, que comprende fosfato de calcio poroso que tiene microporosidad superficial, y un vehículo libre de agua, en el que el vehículo tiene una Vida de Estabilidad Dimensional, que es el período de tiempo durante el cual el polímero, en un medio de temperatura corporal humana tarda en disolverse o disociarse sustancialmente como máximo una semana.

10 Se divulga además, el uso de vehículos libres de agua, según se menciona en la presente anteriormente, para ayudar a suministrar y contener un biomaterial poroso superficial, que es preferiblemente osteoinductivo, mientras que se conserva su osteoinductividad.

15 Descripción detallada de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier objeto que cae por fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona con fines informativos únicamente. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a materiales cerámicos de la presente invención para uso en un método para tratamiento o cirugía del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o cirugía).

20 Materiales bioactivos (microporosos) de superficie microestructurada, preferiblemente osteoinductivos

Estudios anteriores han demostrado que determinados materiales pueden inducir la formación ósea en sitios ectópicos no óseos tales como el músculo. La microestructura de superficie de los materiales ha demostrado que cumple un rol importante en este proceso de inducción ósea (osteoinducción). La hipótesis actual para formación ósea inducida por material es que la adsorción de proteínas y factores de crecimiento, continuando con la migración y fijación de células madre o progenitoras y su proliferación y diferenciación osteogénica posteriores cumplen un rol importante [H. Yuan *et al.*, *Biomaterials* 20:1799-1806 (1999); P. Habibovic *et al.*, *Biomaterials* 26:3565-3575 (2005)].

30 La osteoinductividad de materiales, tales como fosfato de calcio, se define como la propiedad mediante la cual los materiales inducen la formación ósea ectópica en sitios no óseos sin la adición de células osteogénicas o factores de crecimiento óseo antes del implante. De manera general, una inducción ósea como tal se define como el mecanismo por medio del cual un tejido mesenquimal se induce para cambiar su función celular y convertirse en osteogénico.

35 La invención se dirige a materiales de fosfato de calcio, que son preferiblemente osteoinductivos, que tienen una microestructura superficial y, en particular, una microporosidad superficial. La microporosidad se define en la presente como aquella que corresponde a poros que tienen un tamaño inferior a 1,5 µm según se determina con intrusión de mercurio y microscopía electrónica de barrido. La microestructura superficial indica, de manera general, que la superficie comprende protrusiones y/o hendiduras en una microescala, a saber, inferior a 10 µm, preferiblemente inferior a 5 µm, y más preferiblemente, inferior a 1,5 µm.

40 Un modo para obtener fosfato de calcio que tiene microporosidad superficial se divulga en US 6,511,510. Aquí se proporciona un material (macro)poroso y se somete a un tratamiento ácido para crear microporos en la superficie de los macroporos. Este material tiene una porosidad total del 20 al 90% en el que los macroporos se presentan teniendo un tamaño que varía de 0,1 a 1,5 mm y en el que los microporos se presentan teniendo un tamaño que varía de 0,05 a 20 µm.

45 El material cerámico es fosfato de calcio. El fosfato de calcio preferido es fosfato octacálcico, apatitas, tales como hidroxiapatita o apatita de carbonato, whitlockitas, tales como fosfato tricálcico [alfa] y fosfato tricálcico [beta], y combinaciones de estos.

50 Un aspecto importante de estos materiales cerámicos, que son preferiblemente osteoinductivos, se refiere a la estructura física del material, en particular, un biomaterial. El material comprende tanto macroporos como microporos. La porosidad total varía del 20 al 90%, preferiblemente, del 40 al 80% y, más preferiblemente, de entre el 50 y el 80%. Las macroporos del material tiene un tamaño de 0,1 a 1,5 mm; preferiblemente, el tamaño de los macroporos yace entre 0,2 y 1 mm. El tamaño de los macroporos tiene una influencia beneficiosa significativa en, por ejemplo, el carácter osteoinductivo del material, en particular, si los macroporos se encuentran interconectados.

55 Los microporos del material tienen un tamaño de 0,05 a 20 µm. Un rango preferido para el tamaño de los microporos es de 0,1 a 10 µm, 0,1 a 3 µm, o 0,1 a 5 µm, preferiblemente, 0,1 a 1,5 µm. Los microporos se presentan en la superficie de los macroporos.

60 La microporosidad de la superficie del material yace preferiblemente entre el 20 y el 60%, preferiblemente, entre el 30 y el 50%. De acuerdo con US 6,511,510, el biomaterial consiste preferiblemente en cristales. Preferiblemente, el tamaño de los cristales es similar al tamaño de los microporos, ya que esto da como resultado la microrugosidad del biomaterial. De este modo, el tamaño de los cristales yace entre 0,1 y 1,5 µm.

- Otro modo, y preferido, para obtener fosfato de calcio que tiene microporosidad superficial se divulga en WO 2007/094672. Esto se refiere a un material de fosfato de calcio poroso, que es preferiblemente osteoinductivo, que tiene un tamaño de grano promedio en un rango de 0,1 a 1,5 μm , una porosidad que comprende microporos en un rango de tamaño de 0,1 a 1,50 μm , y que tiene un porcentaje de área superficial de microporos en un rango del 10 al 40%. El porcentaje de área superficial de microporos es preferiblemente inferior al 40%, más preferiblemente del 1 al 30% o del 1 al 20%, de mayor preferencia, en un rango del 10 al 25%.
- Un fosfato de calcio poroso de la presente invención tiene, preferiblemente, una capacidad de adsorción de proteínas de, al menos, el 40%, preferiblemente, del 40 al 100%, del 50 al 100%, del 60 al 100%, del 70 al 100%, del 80 al 100% o del 90 al 100%. La capacidad de adsorción se expresa como el porcentaje de proteína que se adsorbe por un volumen de 1,0 ml de dicho fosfato de calcio a partir de un volumen de 3 ml de una solución acuosa al 1% de suero fetal bovino (FBS) en presencia de 25 ppm de azida de sodio (NaN_3) después de 24 h a 37 °C.
- En la presente invención, la superficie microestructurada, en particular, la superficie microporosa de fosfato de calcio se puede mezclar con un vehículo. Con este fin, el fosfato de calcio se encuentra, de manera general, en la forma de materia en partículas, preferiblemente, granular o en polvo, ya sea de forma irregular o regular, por ejemplo, amorfa, o prismas geométricos simples como cubos, cuboides, esferas o cilindros.
- Un fosfato de calcio poroso que es preferiblemente osteoinductivo según se usa en la presente invención se encuentra preferiblemente en la forma de micropartículas que tienen un tamaño de partícula que varía de aproximadamente 45 a aproximadamente 1500 μm , más preferiblemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 μm , más preferiblemente de 45-106 μm , de 106-212 μm , o de 212-300 μm .
- En otra realización preferida de la invención, el polvo de fosfato de calcio es TCP o BCP. El BCP es una mezcla de TCP y HA, constituyendo HA más del 0% y menos del 100% de la mezcla, de mayor preferencia con gránulos más grandes que 45 μm .
- En inclusive otra realización de la invención, las micropartículas que se recolectan después de la trituración del fosfato de calcio sinterizado se limpian posteriormente de manera, por ejemplo, ultrasónica con acetona, etanol y/o agua, y, de manera opcional, se secan y se esterilizan.
- En inclusive una realización preferida adicional de la invención, el polvo de fosfato de calcio es un polvo que se tritura y se seca en horno que tiene partículas de forma irregular.
- Con un fin de obtener propiedades osteoinductivas óptimas, el fosfato de calcio tendrá preferiblemente un tamaño de partícula de al menos 45 μm . El límite superior preferido para el tamaño de partícula es de 4000 μm , a pesar de que no se excluyen tamaños de partícula mayores y son ventajosos en cuanto a su mayor facilidad de manejo de parte del profesional médico. El tamaño de partícula se selecciona más preferiblemente a partir del grupo que consiste en 45 μm a 1000 μm , 45-500 μm y, más preferiblemente, 45-300 μm , 45 μm a 150 μm , 150 μm a 1000 μm , 150 μm a 500 μm , 500 μm a 1000 μm , 1000 μm a 2000 μm , 1000 μm a 4000 μm , y mezclas de estos. En una realización preferida, el fosfato de calcio de cualquiera de los tamaños de partícula indicados se usa para la preparación de una preparación moldeable y/o inyectable de la invención, a saber, para cualquier inyectable o masilla.
- Los materiales cerámicos resultantes, que son preferiblemente osteoinductivos, que se realizan mediante combinación de partículas de fosfato de calcio y un vehículo libre de agua, según se divulga en la presente invención se encuentran preferiblemente en la forma de masillas o inyectables. Las masillas se aplican al sitio quirúrgico mediante la mano o un instrumento quirúrgico, y cumplen con las propiedades de manejo en cuanto a que pueden ser moldeables, maleables, y/o amasables. Los materiales inyectables pueden fluir y extruirse a través de una boquilla para jeringa convencional o personalizada mediante fuerza manual o con la ayuda de un dispositivo dispensador mecánico (por ejemplo, una pistola selladora) y pueden moldearse además mediante extrusión. Preferiblemente, la fuerza requerida para extruir un material cerámico inyectable de la presente invención es menor de 100 N. En términos generales, las masillas se caracterizan por su mayor rigidez que da como resultado una capacidad de moldeo óptima, mientras que los inyectables se caracterizan por su menor rigidez y su capacidad de fluir que da como resultado una extrusión óptima a través de una jeringa convencional o personalizada.
- Vehículo libre de agua
- Un vehículo libre de agua se define como un aglutinante en cualquier forma molecular, por ejemplo, como pasta, gel, polvo o de forma granular, que retiene un componente activo de manera física. El uso de un vehículo libre de agua de la presente invención permite un manejo y una aplicación optimizados del ingrediente activo con respecto al sitio de tratamiento. Por ejemplo, el material cerámico que es preferiblemente osteoinductivo, de la presente invención, es inyectable durante procedimientos mínimamente invasivos, debido a las características de capacidad de fluido del vehículo libre de agua que comprenden las partículas cerámicas. En otro ejemplo, el material cerámico de la presente invención, que es preferiblemente osteoinductivo, es una masilla que puede moldearse que encaja en defectos de forma compleja y que permite mantenimiento a largo plazo del componente activo en el sitio de tratamiento debido a las características de poder moldearse y malearse impartidas por el vehículo libre de agua.

5 El vehículo libre de agua de la presente invención se usa frente a vehículos que contienen agua (por ejemplo, JAX Bone Void Filler®, Smith and Nephew, que comprende gel acuoso de carboximetilcelulosa) con el fin de conservar la microestructura superficial de las partículas cerámicas, que son preferiblemente osteoinductivas, de mejor manera. La naturaleza de la estructura cristalina de la cerámica de fosfato de calcio y la química lo vuelven susceptible a la desintegración en medios acuosos. De este modo, los materiales de fosfato de calcio que contienen agua demuestran una vida útil limitada, o deben reconstituirse o mezclarse de manera inconveniente en el quirófano antes del implante.

10 Además, si el fosfato de calcio se microestructura, como en la presente invención, esta desintegración puede afectar de manera adversa su efecto deseado tal como la osteoinductividad. Por lo tanto, los vehículos libres de agua contienen y almacenan partículas de fosfato de calcio con el fin de prolongar la vida útil de tales materiales cerámicos microestructurados. Además, los vehículos libres de agua permiten la conveniencia de un material cerámico listo para uso, que es preferiblemente osteoinductivo, sin reconstitución o mezcla de componentes antes del implante.

15 El tiempo de disolución rápido del vehículo libre de agua se prefiere además de manera tal que la microestructura superficial de las partículas de fosfato de calcio comprendidas, que son preferiblemente osteoinductivas, puede exponerse al medio del implante de manera más expeditiva, influyendo para obtener una respuesta osteoinductiva lo más pronto posible después del implante.

20 Un vehículo libre de agua, según se define en la reivindicación 1, comprende un componente orgánico, por ejemplo, polímeros a base de péptidos, polipéptidos, proteínas, lípidos, azúcares, preferiblemente, sacáridos y/o polisacáridos, tales como dextrano, xantano, polioles, tales como alcohol polivinílico y glicerol, otros polímeros sintéticos como el polietilenglicol (PEG), poloxámeros, emulsionantes, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, polietilenglicol-660-12-hidroxiestearato, Solutol® HS 15) y mezclas de estos, por ejemplo, xantano disperso en glicerol; carboximetilcelulosa (CMC) dispersa en glicerol; Solutol® HS 15, un tensioactivo no iónico, un emulsionante y un solubilizante basado en ácido hidroxisteárico, combinado con poloxámeros; dextrano, xantano y/o almidón disperso en glicerol; CMC disperso en glicerol y PEG 400; u otras formulaciones descritas en los Ejemplos 4-6. En una realización preferida, el vehículo libre de agua es un polímero libre de agua, o una mezcla de polímeros libres de agua, que proporciona una vida útil significativamente más prolongada a las partículas osteoinductivas comprendidas, en comparación, por ejemplo, con lo que haría un vehículo que comprende agua, a saber, un polímero acuoso, por ejemplo un gel polimérico con un disolvente fisiológicamente aceptable, en particular agua y/o solución salina fisiológica. El vehículo libre de agua sirve, según se menciona anteriormente, como un aglutinante para partículas de fosfato de calcio y, de este modo, se presenta durante la administración (por ejemplo, inyección o implante) de los materiales de fosfato de calcio de la invención a un sujeto. El vehículo se selecciona de manera tal que permite que el material de fosfato de calcio mantenga sus propiedades características tales como osteoinductividad.

35 Las propiedades características tales como osteoinductividad se mantienen preferiblemente si (i) la microestructura se conserva, a saber, mediante preempaquetamiento de las partículas, por ejemplo, partículas osteoinductivas con un vehículo libre de agua, y (ii) el vehículo libre de agua es según se define en la reivindicación 1 y se selecciona preferiblemente a partir del grupo que consiste en: xantano, dextrano y almidón suspendido en glicerol; xantano, dextrano y Solutol® HS 15 suspendidos en glicerol; CMC suspendido en glicerol; CMC suspendido en PEG 400 y glicerol; lecitina de soja suspendida en poloxámero F88; poloxámero F127 mezclado con polietilenglicol-660-12-hidroxiestearato, Solutol® HS 15; u otros vehículos libres de agua descritos en los Ejemplos 4-6; que se disuelven o desintegran antes de que, por ejemplo, tenga lugar la formación ósea. La desintegración se refiere a la característica de un vehículo libre de agua para disolverse, disociarse, o, de otra manera, romperse después de la colocación (por ejemplo, mediante inyección o implante manual) en el cuerpo humano. Aquí, la disolución se define por el desenredo y la separación de las moléculas de polímero en solución acuosa (a saber, solución salina o sangre) y se evalúa visualmente con respecto al tiempo. Los vehículos libres de agua específicos, por ejemplo, para materiales osteoinductivos de superficie microporosa no tienen precedentes en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 2003/028779 anteriormente mencionado. Un requisito se refiere a que el aglutinante orgánico que se usa allí no desaparezca, a saber, se disuelva o se disocie, hasta que haya tenido lugar, por ejemplo, la formación ósea en la medida suficiente como para tomar la función del hueso vivo.

40 De este modo, de manera esencial, el vehículo libre de agua sirve como vehículo para suministro en la administración (introducción en el cuerpo mediante inyección o implante) de los materiales de superficie microporosa, que son preferiblemente osteoinductivos, pero después, se debe disociar mediante disolución u otros modos de desintegración, permitiendo, por ejemplo, la formación ósea activa *in situ*.

45 A tal respecto, la invención se refiere además a un método para promover el crecimiento óseo en un sujeto que así lo necesita, mediante la introducción en el cuerpo del sujeto de un material, que es preferiblemente osteoinductivo, en el que el material se combina con un vehículo libre de agua biocompatible y en el que el vehículo libre de agua es una auxiliar de procesamiento que comienza a disolverse o disociarse después de la introducción en el cuerpo del sujeto y antes del inicio de la formación ósea del material. Más particularmente, el vehículo libre de agua en la presente se disuelve o disocia sustancialmente antes de que la formación ósea se complete y, preferiblemente, antes del inicio de la formación ósea. Esto último permitirá el beneficio total que se obtiene de la microporosidad superficial de los materiales presentes, que son preferiblemente osteoinductivos.

Los vehículos libres de agua según se definen en la reivindicación 1 se seleccionan a partir de las siguientes clases:

- 5 – carbohidratos, por ejemplo: azúcares, tales como sacáridos, compuestos celulósicos (por ejemplo, CMC, hidroxietilcelulosa), alginatos, quitosano, dextrano, guar, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitoles, fructosa, pectina, almidón, xantano, xilano, manano y mezclas de estos,
- proteínas, péptidos o polipéptidos, por ejemplo: fibrina, gelatina, colágeno y mezclas de estos,
- 10 – lípidos, por ejemplo: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, lípidos de esteroides, lípidos prenol, sacarolípidos, lecitina de soja y mezclas de estos,
- polioles, por ejemplo: glicerol, propilenglicol (1,2-propilenglicol, 1,3-propilenglicol), butilenglicol, hexilenglicol y mezclas de estos,
- 15 – polímeros orgánicos sintéticos, por ejemplo: polietilenglicoles (PEG, también llamados óxidos de polietileno PEO) y/o poloxámeros (por ejemplo, Pluronic®, como P65, P84, P85, F87, F88, F98 (por ejemplo, BASF Benelux) y F127 (por ejemplo, Sigma)), tensioactivos y emulsionantes (por ejemplo, Solutol® HS 15), ceras y mezclas de estos,
- 20 así como mezclas de estos vehículos libres de agua como xantano, dextrano, almidón y glicerol (XDS); CMC, PEG4k, PEG400 y glicerol (CMC/PEG); lecitina de soja y F88 (SLF88); xantano, dextrano y Solutol® HS 15 (XDHS); CMC y glicerol (CMCG); xantano y glicerol (XG); y polietilenglicol-660-12-hidroxiestearato, Solutol® HS 15 y F127 (HSF).

25 Con el fin de desaparecer oportunamente, el vehículo se desintegrará y se disolverá en particular, al tener una solubilidad adecuada en agua a temperatura corporal humana (37 °C), o se disociará mediante cualquier otro modo biológico. Los vehículos libres de agua de la presente invención se disuelven preferiblemente a temperatura corporal humana (37 °C) en un regulador fisiológico (por ejemplo, solución de regulador de fosfato, PBS).

30 Vehículos libres de agua preferidos se caracterizan por las siguientes propiedades. En un primer aspecto, el vehículo libre de agua se selecciona de manera tal que tiene un tiempo de disolución *in vivo* menor de una semana, preferiblemente, menor de 3 días, y más preferiblemente menor de un día, en el que se disuelve preferiblemente en un 10 - 100%, 10 - 90%, 10 - 80%, 10 - 70%, 10 - 60%, 10 - 50%, más preferiblemente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. Más preferiblemente, el tiempo de disolución es menor de 12 horas, seis horas, tres horas, dos horas, una hora, o 30 minutos. En una realización preferida, 10 - 100%, 10 - 90%, 10 - 80%, 10 - 70%, 10 - 60%, 10 - 50%, más preferiblemente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% del vehículo se disuelve en el tiempo de disolución.

35 En cuanto a la velocidad de disolución, durante una operación quirúrgica, se prefiere si el vehículo libre de agua tiene un tiempo de disolución mínimo que permite que el cirujano forme o inyecte el material o suture la herida sin que exista riesgo de dispersión de partículas. Después, cuanto más rápida sea la disolución, más beneficioso puede resultar esto para la formación ósea. Los vehículos libres de agua basados en glicerol, poloxámero, polietilenglicol, CMC, xantano y/o Solutol® HS 15 son los preferidos a este respecto. A este respecto, se prefiere un inicio de disolución *in vivo* de al menos una hora. Con todo, se prefiere si el inicio de la disolución ocurre en 1-3 horas, y si la finalización de la disolución ocurre en 3 horas a un día (24 horas), y preferiblemente en 6-12 horas, cuando se disuelve 10 - 100%, 10 - 90%, 10 - 80%, 10 - 70%, 10 - 60%, 10 - 50%, más preferiblemente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% del vehículo. El vehículo se selecciona para que se encuentre libre de agua de manera tal que la superficie de la microestructura de las partículas osteoinductivas no tenga que someterse a fenómenos potenciales de disolución/precipitación que pueden conducir a cambios en las propiedades de la superficie y, de este modo, a cambios en las propiedades características tal como osteoinductividad. Con todo, el vehículo es libre de agua, de modo que se mantienen las propiedades características, por ejemplo, la osteoinductividad. Por lo tanto, el uso de un vehículo libre de agua permite una vida útil más prolongada de las masillas premezcladas, que son preferiblemente osteoinductivas, en comparación con cualquier otro tipo de vehículo.

40 En otro aspecto, el vehículo libre de agua se selecciona para tener, cuando se combina con partículas de fosfato de calcio, que son preferiblemente osteoinductivas, un tiempo de disolución completo cuando se mide de manera convencional en una solución de regulador de fosfato (PBS), o en una solución salina fisiológica, a 37 °C en una semana, preferiblemente en 3 días, y más preferiblemente en un día, de mayor preferencia en 1 a 12 horas. La medida convencional de acuerdo con la invención se realiza en un cilindro de un volumen dado (1,0 cc) en el que las partículas, que son preferiblemente osteoinductivas, se dispersan en una relación dada de partículas de fosfato de calcio al vehículo libre de agua. En esta prueba, el inicio de la disolución se observa por inspección visual del cilindro, ya que el inicio de la disolución se evidencia por un cambio en la forma aparente. La disolución completa, según se define en esta prueba, ocurre cuando se observa que todo el volumen de partículas de fosfato de calcio visiblemente se dispersa de manera libre en la solución, sin una forma aparente u organización perceptible de ninguna manera, a saber, una capa plana de partículas de fosfato de calcio sueltas.

De acuerdo con la invención, se prefiere que la disolución comience en 0,5-6 horas, preferiblemente 1-6 horas, de mayor preferencia, 1-3 horas, y se complete en 1-24 horas, 3-24 horas o 6-24 horas, preferiblemente 1-12, 3-12, 6-12 horas, más preferiblemente en 1-8, 2-8, 3-8 o 6-8 horas después de la administración quirúrgica.

5 El tiempo de disolución de la masilla, que es preferiblemente osteoinductiva, en un regulador, por ejemplo, fluidos fisiológicamente aceptables, en particular agua, solución salina o PBS es preferiblemente de 1 a 720 min., 1 a 180 min., 1 a 120 min., 1 a 100 min., 1 a 60 min., 5 a 60 min., 10 a 60 min., 20 a 60 min., o 30 a 60 min, preferiblemente el tiempo de disolución es <7200 min., <180 min., <120 min., <100 min., <60 min., <30 min., o <5 min. después de la inmersión en un regulador.

10 En inclusive otro aspecto, el vehículo se selecciona para tener una Vida de Estabilidad Dimensional (DSL) de, como máximo, una semana, preferiblemente, como máximo, 3 días, y más preferiblemente, como máximo, un día. DSL se refiere al período de tiempo durante el cual el polímero, en un medio de temperatura corporal humana, no se disuelve o disocia sustancialmente, y se determina por la misma inspección visual de los mismos cilindros convencionales que se mencionan anteriormente. La evaluación es diferente en cuanto a que la inspección no se extiende a las partículas disociadas del cilindro, sino que solo lo hace a las dimensiones del cilindro. El DSL es preferiblemente similar al inicio de disolución que se menciona anteriormente, y por lo tanto, se prefiere un DSL que tiene un tiempo de disolución de como máximo 1-24, 1-12, 1-6 horas, preferiblemente como máximo 1-3 horas después de la colocación en un medio de temperatura corporal humana.

20 Los vehículos libres de agua, mediante los cuales se pueden obtener los valores anteriores, se seleccionan a partir del grupo que consiste en (i) polisacáridos (por ejemplo, dextrano, xantano, almidón, pectina, CMC), (ii) lípidos (por ejemplo, lecitina de soja), (iii) polioles (por ejemplo, glicerol), (iv) PEG (por ejemplo, PEG 300, PEG 400, PEG 1000, PEG 4000 o PEG 20000), (v) poloxámeros (por ejemplo, P237, P238, P288, P407, P185, P234, P235, P65, P84, P85, F87, F88, F98, F127), (vi) tensioactivos y/o emulsionantes (por ejemplo, polietilenglicol-660-12-hidroxiestearato, Solutol® HS 15) y mezclas de estos.

30 En una realización preferida, un vehículo libre de agua de la presente invención, cuando se combina con partículas de fosfato de calcio tiene características de manejo que se describen como cohesivas, moderadamente adhesivas y razonablemente rígidas similares a las de la goma de mascar. En una realización preferida, el vehículo libre de agua que contiene partículas de fosfato de calcio puede manejarse, moldearse y manipularse sin impartir residuos excesivos o pegajosidad a los guantes quirúrgicos. En otra realización preferida, un vehículo libre de agua combinado con partículas de fosfato de calcio se inyecta a través de una jeringa convencional. En una realización preferida, el vehículo libre de agua combinado con partículas de fosfato de calcio puede resistir irrigación quirúrgica con solución salina o agua, normal en un procedimiento quirúrgico aplicable. De manera funcional, estos vehículos libres de agua ofrecen la ventaja de ser (i) manejables, maleables, amasables, moldeables y/o inyectables, es decir, capaces de deformarse o fluir bajo tensión de compresión, (ii) suficientemente cohesivos y pegajosos lo que permite que se unan físicamente con las partículas y se adhieran al hueso circundante, y (iii) son solubles en agua y se degradan rápidamente a 37 °C, pero son temporalmente resistentes a la irrigación quirúrgica normal. Un vehículo libre de agua o una combinación de vehículo libre de agua de la invención, solo o en combinación con fosfato de calcio poroso, que es preferiblemente osteoinductivo, muestra estas características de manejo ventajosas basadas en su composición química "que puede ajustarse". De manera específica, un vehículo libre de agua de la presente invención puede realizarse para que sea moldeable o inyectable de manera ideal al variar las proporciones de los componentes químicos comprendidos, el tiempo de curado, y/o temperatura de curado, por ejemplo, 1% (p/v) de CMC suspendido en glicerol se usa como un inyectable, mientras que 15% (p/v) de CMC suspendido en glicerol se usa como una masilla; además, 2% (p/v) de xantano suspendido en glicerol y curado durante 45 minutos a 80 °C se usa como un inyectable, mientras que la misma formulación curada durante 1,5 horas a 98,5 °C se usa como una masilla.

50 Fabricación

Los materiales de fosfato de calcio de superficie microporosa, que son preferiblemente osteoinductivos pueden prepararse de acuerdo con, por ejemplo, las referencias US 6.511.510 y WO 2007/94672 que se mencionan anteriormente. De este modo, un método incluye sinterizar un material cerámico en condiciones tales que se obtiene un biomaterial, que es preferiblemente osteoinductivo según se describe anteriormente. El material cerámico se encuentra, antes de la sinterización, en un estado calcinado. La sinterización se realiza preferiblemente a una temperatura de entre 1000 y 1275 °C, se trata con una solución acuosa de un ácido orgánico y se lava para retirar el ácido. Más preferiblemente, la sinterización se lleva a cabo a una temperatura de entre 1150 y 1250 °C. La duración de la etapa de sinterización se puede elegir adecuadamente entre 6 y 10 horas, preferiblemente entre 7 y 9 horas. Se ha encontrado que realizar la sinterización mientras el material cerámico se encuentra sumergido en un polvo del material cerámico resulta ser ventajosa también. Esto afecta de manera beneficiosa la reactividad de la superficie del material y, por consiguiente, también la bioactividad, por ejemplo, basada en la disolución, reprecipitación, etc. Después de la sinterización, el material se tritura preferiblemente con papel de lija, tal como papel de lija de Si-C, para retirar impurezas químicas de la superficie. Posteriormente, el material se trata con una solución acuosa de un ácido.

65 Los ácidos adecuados a este respecto son cualquier ácido de grabado, es decir, cualquier ácido que conduzca a una ligera disolución del material basado en fosfato de calcio. Se ha encontrado que el uso de los siguientes ácidos, por ejemplo, conduce a resultados favorables: ácido maleico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico y combinaciones de estos.

La concentración del ácido en la solución se elige preferiblemente de manera tal que el pH de la solución se encuentra entre 0 y 4, más preferiblemente entre 1 y 3. Después del tratamiento con ácido, que preferiblemente dura entre 3 y 15 minutos, el material cerámico se lava hasta retirar el ácido. El lavado puede realizarse adecuadamente usando etanol, agua o una combinación de estos.

El material cerámico se puede preparar mediante un método para producir una cerámica porosa de fosfato de calcio, que es preferiblemente osteoinductiva, que comprende una suspensión acuosa de un polvo de fosfato de calcio que tiene un tamaño de partícula de 1,0-8,0 μm , preferiblemente de 2,0-4,0 μm , un agente espumante y, de manera opcional, un agente porógeno en agua; sometiendo la suspensión a condiciones que provocan la formación de espuma de dicha suspensión; secando la suspensión espumosa resultante, de manera opcional, retirando el agente porógeno, para proporcionar un cuerpo verde poroso y sinterizando el cuerpo verde poroso a una temperatura de entre 1050 °C y 1150 °C para proporcionar el fosfato de calcio sinterizado poroso; y, de manera opcional, triturando el fosfato de calcio sinterizado a partículas y recolectando las partículas que tienen un tamaño de partícula que varía de aproximadamente 40 a aproximadamente 1500 μm . En una realización preferida, el método incluye además la etapa de triturar el fosfato de calcio sinterizado a partículas, en el que las partículas se recolectan usando tamices, preferiblemente tamices de 45 y 500 μm para proporcionar una fracción de micropartículas de 45-500 μm , y más preferiblemente tamices de 45 y 300 μm para proporcionar una fracción de micropartículas de 45-300 μm , y de mayor preferencia, tamices de 45 y 150 μm para proporcionar una fracción de micropartículas de 45-150 μm , para preparar formulaciones inyectables. De mayor preferencia, las micropartículas tienen un tamaño de 45-106 μm , 106-212 μm o 212-300 μm . En una realización preferida, el método incluye además la etapa de trituración del fosfato de calcio sinterizado a partículas, en el que las partículas se recolectan usando tamices, preferiblemente tamices de 150-500 μm , 500-1000 μm y 1000-2000 μm para proporcionar una fracción de micropartículas de 150-500 μm , 500-1000 μm y 1000-2000 μm para preparar formulaciones de masilla moldeables o inyectables.

El polvo de fosfato de calcio es un polvo que se compone de cristales que tienen un tamaño de cristal de entre 0,1 y 1,5 μm . El agente espumante puede ser peróxido de hidrógeno. El agente porógeno puede comprender partículas de naftaleno, en el que el agente porógeno se retira mediante evaporación a 80-110 °C.

El agente porógeno puede comprender partículas de cera, en el que el agente porógeno se retira mediante formación de espuma a 50-70 °C, continuando con presinterización a 980-1020 °C. Dichas condiciones que originan la formación de espuma de dicha suspensión comprenden calentamiento de la suspensión a aproximadamente 50-70 °C.

La suspensión seca y espumada se sinteriza a una temperatura de 1050-1100 °C en el caso de TCP, más preferiblemente, de 1050-1075 °C, o a una temperatura de 1100-1150 °C en el caso de HA y/o BCP. Las partículas de fosfato de calcio se mezclan con el vehículo libre de agua en una relación volumétrica de 1:10 a 10:1, preferiblemente en una relación de 2:5 a 5:2, más preferiblemente en una relación comprendida entre 1:2 a 2:1, y, de mayor preferencia, de 3:2 para la fabricación de material, que es preferiblemente osteoinductivo. El vehículo libre de agua comprende o consiste en una mezcla de vehículos libres de agua, por ejemplo, una mezcla de dos poloxámeros, una mezcla de un poloxámero y polietilenglicol, una mezcla de polímero de óxido de polietileno y glicerol, o una mezcla de poloxámero y glicerol.

En una realización preferida adicional (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 4 y 5), los vehículos libres de agua se confeccionan de acuerdo con el mismo procedimiento general:

- Las masas de los componentes de polvo seco se miden en masa o volumen y se mezclan completamente en un disolvente no acuoso a temperatura ambiente o más caliente, por ejemplo, de 22 °C a 98,5 °C.

- Los polímeros sintéticos como el PEG, los poloxámeros o los tensioactivos se funden y luego se combinan en esta mezcla dando como resultado una solución vehículo completa.

- La solución vehículo se calienta a una temperatura específica, por ejemplo XDS que se calienta a 98,5 °C, durante un tiempo específico por ejemplo, 45 min, con o sin agitación.

- La solución vehículo se retira del calor y se enfría naturalmente a temperatura ambiente o rápidamente con refrigeración, con o sin agitación. Luego se almacena para su combinación a temperatura ambiente.

Las partículas de fosfato de calcio, por ejemplo, TCP o BCP, no deben almacenarse con vehículos que contienen agua. Preferiblemente, el material de la presente invención, que es preferiblemente osteoinductivo, por ejemplo, presentaciones de masilla o material inyectable se preparan como:

- masilla premezclada o material inyectable, que es preferiblemente osteoinductivo: una mezcla de partículas, que es preferiblemente osteoinductiva, y un vehículo soluble en agua libre de agua en un recipiente apropiado (jeringa o un vial),

– mezcla de masilla seca o material inyectable, que es preferiblemente osteoinductivo, a saber, un recipiente que combina partículas, que es preferiblemente osteoinductivo, con el vehículo libre de agua en forma de polvo libre de agua (es decir, liofilizado). La masilla o material inyectable se rehidrata en el quirófano usando solución salina estéril o sangre, médula ósea del paciente, o cualquier otro fluido corporal del paciente.

Usos

Los materiales de la invención pueden usarse en cualquier aplicación donde, en un animal y preferiblemente un ser humano, se desea el crecimiento óseo. En particular, la invención tiene uso como relleno sintético de huecos óseos. La población objetivo preferida son individuos con defectos óseos como resultado de un trauma o cirugía. Los sitios anatómicos preferidos son: huecos o huecos óseos del sistema esquelético, a saber, las extremidades, la columna vertebral y la pelvis, las áreas cráneo-maxilofaciales. De acuerdo con esto, el material inyectable o masilla está previsto para uso como relleno de huecos óseos para huecos y espacios en estructuras óseas sin soporte. Se indica para uso en el tratamiento de defectos óseos creados quirúrgicamente o defectos óseos que resultan de una lesión traumática en el hueso. El material inyectable o masilla está previsto para empaquetarse en huecos óseos o espacios del sistema esquelético (es decir, extremidades, columna vertebral y pelvis).

Con referencia a las propiedades de los presentes fosfatos de calcio de superficie microporosa, tal como la osteoinductividad, no es necesario agregar materiales activos para promover el crecimiento óseo. Se puede usar cualquiera de tales materiales activos, ejemplos de los cuales incluyen agentes biológicamente activos, factores de crecimiento y hormonas, células tales como células madre, células osteogénicas y células osteoprogenitoras.

La invención se explicará de manera adicional en adelante con referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras. Los ejemplos y las figuras son solo ilustrativos y permiten la extrapolación a los resultados del uso *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, y no limitan la invención.

Figura 1. Secciones histológicas representativas muestran abundante formación ósea en las muestras de BCP de 212-300 μm (A), 106-212 μm (B) y 45-106 μm (C) mientras que no hay hueso en muestras de menos de 45 μm (D) (secciones no descalcificadas que se tiñen con azul de metileno y fucsina básica; rojo: hueso y oscuro: materiales implantados).

Figura 2. Datos histomorfométricos que muestran el porcentaje del área de hueso en toda la muestra, el porcentaje del área de hueso en el espacio disponible, y el volumen de hueso en muestras de partículas de BCP con diferente tamaño de partícula.

Figura 3: Secciones transversales histológicas representativas de defectos de ala ilíaca de tamaño crítico implantados con masilla cerámicos P84/F87, C: masilla cerámica P85/PEG4000 y partículas de TCP solas (control).

Figura 4: Sección transversal histológica representativa de defectos femorales caninos (Fig. 4a) e implantes intramusculares (Fig. 4b) que contiene masillas osteoinductivas libres de agua e inyectables a las 12 semanas, teñidas con fucsina básica y azul de metileno para visualizar la formación ósea. Fig. 4a) Los defectos femorales muestran que se mantuvieron los gránulos de TCP (marrón claro, negro) en los defectos rodeados por una extensa regeneración ósea (rosa). Fig. 4b) Secciones de implante intramuscular de vehículo CMCG que contiene gránulos de TCP osteoinductivos (150-500 μm) (A) o gránulos de TCP (150-500 μm) solos (B). Extensa formación de hueso (rosa) en todo el implante CMCG (A) demuestra la osteoinductividad de los gránulos de TCP comprendidos en tal vehículo libre de agua.

Ejemplos

Ejemplo 1: Osteoinducción de partículas cerámicas inyectables *in vivo*

Partículas cerámicas (cerámica de fosfato de calcio bifásico, BCP) menores de 45 μm , de 45-106 μm , de 106-212 μm y de 212-300 μm se prepararon con tamices, se limpiaron de manera ultrasónica, se secaron y luego se esterilizaron.

Se implantaron partículas cerámicas (1000 \pm 10 mg por muestra) en el músculo paraespinal de 8 perros mestizos durante 12 semanas para evaluar la formación ósea inductiva. Con el permiso del comité local para el cuidado de animales, se realizó la operación quirúrgica en 8 perros mestizos de esqueleto maduro (machos, 10-15 kg) obtenidos de un criador de ganado local. Después de anestesiarse a los perros mediante una inyección intraabdominal de pentobarbital de sodio (30 mg/kg de peso corporal), se les afeitó la espalda y la piel se limpió con yodo. Luego se realizó una incisión longitudinal y el músculo paraespinal quedó expuesto por separación roma. Posteriormente se realizaron incisiones musculares longitudinales con bisturí y se crearon bolsas musculares mediante separación roma. Las partículas cerámicas se introdujeron luego en las bolsas musculares con la ayuda de una jeringa de 2 ml y la herida se cerró en capas usando suturas de seda. Se crearon cuatro cavidades musculares separadas al menos por 2 cm de distancia en cada lado del músculo paraespinal, y en cada cavidad se implantó una muestra. A continuación de la cirugía, cada perro recibió penicilina por vía intramuscular durante 3 días consecutivos para prevenir la infección.

Doce semanas después del implante, se sacrificaron los animales y se recolectaron los implantes con los tejidos circundantes y se fijaron de manera inmediata en solución de formaldehído regulada al 4% (pH= 7,4). Después de lavarlos con solución de regulador de fosfato (PBS), se recortaron cuidadosamente los tejidos blandos que rodeaban los explantes y se midió el volumen de los explantes (V_e) mediante desplazamiento de agua. Luego, se deshidrataron los explantes en una serie de soluciones de alcohol (70%, 85%, 90%, 95% y 100% x2) y se incluyeron en metacrilato de metilo (MMA). Se realizaron secciones delgadas (10-20 micrómetros) a través de la mitad de las muestras con una sierra de diamante (SP1600, Leica, Alemania). Las secciones se tiñeron con azul de metileno y fucsina básica.

La histomorfometría se realizó usando el software Adobe Photoshop. Primero, se seleccionó toda la muestra como la región de interés (ROI) y se leyeron los píxeles de la región (ROI), luego tanto el BCP como el hueso mineralizado se pseudocolorearon y los píxeles de BCP y hueso se leyeron como M y B, respectivamente. El porcentaje de área de material en las muestras ($M_i\%$ para implantes y $M_e\%$ para explantes) se calculó como $M \cdot 100 / ROI$, el porcentaje del espacio disponible (porosidad, $P_i\%$ para implantes y $P_e\%$ para explantes) se calculó como $(ROI - M) \cdot 100 / ROI$, el porcentaje de hueso en el espacio disponible de los explantes ($BP\%$) se calculó como $B \cdot 100 / (ROI - M)$ y el porcentaje de área de hueso en toda la muestra ($\% BROI$) se calculó como $B \cdot 100 / ROI$.

Los siguientes datos se encontraban disponibles para análisis y comparación: V_i (volumen de los implantes), V_e (volumen de los explantes), $M_i\%$ (porcentaje de área de BCP en los implantes), $M_e\%$ (porcentaje de área de BCP en los explantes), $P_i\%$ (porcentaje de área de espacio disponible en los implantes), $P_e\%$ (porcentaje de área de espacio disponible en los explantes), $BP\%$ (porcentaje de área de hueso en el espacio disponible de los explantes) y $BROI\%$ (porcentaje de área de hueso en los explantes). El volumen de materiales de BCP en los implantes puede determinarse aproximadamente como $V_i \cdot M_i$, el volumen de BCP en los explantes puede determinarse como $V_e \cdot M_e$ y el volumen de hueso en los explantes puede determinarse aproximadamente como $V_e \cdot BROI\%$.

Resultados

Se formó hueso en todos los implantes que contienen partículas de BCP mayores de 45 μm , mientras que no se formó hueso en aquellos que contienen partículas de BCP menores de 45 μm (Figura 1 y 2). No se encontraron diferencias significativas en la formación ósea entre partículas de 212-300 μm , partículas de 106-212 μm y partículas de 45-106 μm .

Análisis

En este estudio se muestra que el tamaño de partícula influye en la osteoinducción de cerámicos de CaP. Las partículas de tamaño mayor de 45 μm demostraron propiedades osteoinductivas y, de este modo, pueden usarse para desarrollar materiales cerámicos osteoinductivos con vehículos poliméricos adecuados.

Ejemplo 2: Formulación de vehículos libres de agua con características de degradación *in vitro* a medida

En este estudio, se desarrollaron diversas formulaciones de vehículos libres de agua con el objetivo de obtener capacidad de moldeo, capacidad de inyección y cinética de disolución a medida. Estas formulaciones se realizaron usando materias primas con biocompatibilidad probada, historial de uso médico, capacidad de disolución rápida y efecto lubricante, según se resume a continuación:

- Polietilenglicol (PEG): PEG400, PEG1000, PEG4000, PEG20000 (por ejemplo, Merck Chemical Industry),
- Pluronic®: P65, P84, P85, F87, F88, F98 (por ejemplo, BASF Benelux) y F127 (por ejemplo, Sigma),
- Polioli: glicerol (por ejemplo, Merck Chemical Industry),
- Emulsionante: lecitina de soja (por ejemplo, Ingredientes especiales de AMD),
- Carbohidratos: sacarosa (por ejemplo, Sigma Aldrich).

Las formulaciones se realizaron mezclando dos de los componentes anteriores por volumen. Las formulaciones preliminares se seleccionaron por resultar convenientes como un aglutinante de partículas, esto basado en una evaluación de manejo cualitativa. Solo los vehículos que se evaluaron positivamente se mezclaron después con partículas de TCP (500-1000 μm), en una relación volumétrica de 2:3, vehículo a TCP. Estos materiales cerámicos de masilla resultantes se puntuaron luego sobre la base del manejo, la cohesión y la adherencia. Finalmente, la cinética de disolución de cada formulación se evaluó como sigue a continuación: se sumergió un cilindro de 1 cc del material cerámico en 8 cc de solución salina regulada con fosfato (PBS) a 37 °C para imitar el fluido fisiológico del cuerpo. Las muestras se monitorearon luego visualmente en cuanto a la disolución, que se define en la presente como cuando las partículas de fosfato de calcio se disocian libremente del material aparente, formando una capa amorfa de partículas en el fondo del vaso. Se registró el tiempo requerido para ~ 75% de disolución.

Resultados

5 La mezcla de un solo componente, a saber, Pluronic®, PEG, glicerol, lecitina de soja o polímero de sacarosa con partículas de TCP no condujo a formulaciones de masilla cohesivas y moldeables, mientras que mezclar dos de estos componentes potencialmente condujo a formulaciones cohesivas y moldeables. Los mejores puntajes de manejo, cohesión y adherencia se observaron en los cinco materiales cerámicos resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 1: Materiales cerámicos libres de agua seleccionados

Compuesto 1 (% vol)	Compuesto 2 (% vol)	Vehículo/TCP	Observaciones	Tiempo para disolución > del 75%
P84 (75%)	F87 (25%)	2:3	Moldeable, muy cohesivo	<120 min
P85 (60%)	PEG 1000 (40%)	2:3	Moldeable, uniforme, aceitoso, muy cohesivo	<60 min
P85 (90%)	PEG 4000 (10%)	2:3	Moldeable, uniforme, muy cohesivo	<60 min
PEG 4000 (56%)	PEG400 (44%)	2:3	Moldeable	<30 min
F88 (50%)	Lecitina de soja (50%)	2:3	Moldeable	<12 h

10

Análisis

15 La combinación de dos componentes libres de agua tiene un efecto sustancial en las características del vehículo, aunque no todas las combinaciones generan vehículos adecuados. Los materiales resumidos en la Tabla 1 comprenden los vehículos de mejor rendimiento que se desarrollaron en esta investigación. Se prefieren estos vehículos libres de agua para combinarlos con partículas de CaP microestructuradas porque prolongan sustancialmente la vida útil funcional en comparación con los vehículos que contienen agua.

20 Ejemplo 3: Eficacia *in vivo* de tres vehículos libres de agua diferentes

Se prepararon diversos vehículos libres de agua y se combinaron con gránulos de TCP para formar masillas según se describe en el Ejemplo 2. Estas formulaciones se evaluaron a ciegas sobre la base de las características de manejo y dos de cada cinco se seleccionaron para implante *in vivo*. Estas masillas se implantaron en defectos de tamaño crítico (19 mm) en las alas ilíacas de cabras durante un período de 16 semanas. Después del explante, las muestras se fijaron en formalina, se deshidrataron con etanol y se incluyeron en metacrilato de metilo. Se realizaron secciones calcificadas y se tiñeron con azul de metileno y soluciones de fucsina básica para visualizar la formación ósea. La formación ósea en las muestras de masilla se comparó con la de los gránulos de TCP sin vehículo que se implantaron también en las mismas cabras como control. El diseño experimental se resume en la Tabla 2, a continuación.

30

Tabla 2: Resumen del diseño de estudio

Formulación simple	# de sujetos de prueba implantados	Ubicación del implante
Masilla 75% P84, 25% F87	2	Cresta ilíaca
Masilla 90% P85, 10% PEG4000	1	Cresta ilíaca
TCP de 500-1000 μ m	2	Cresta ilíaca

Resultados

35 Las secciones histológicas tomadas de la mitad de los explantes de defectos del ala ilíaca mostraron formación ósea en todos los implantes. Para ambas formulaciones libres de agua, la nueva formación ósea estuvo en contacto con las partículas de TCP comprendidas, lo que indica integración genuina de los materiales en el defecto óseo. La formación ósea en las muestras de P85/PEG4000 (Figura 3A) y P84/F87 (Figura 14B) resultaron comparables con los gránulos de TCP de 500-1000 μ m solos (Figura 3C).

Análisis

5 La calidad de la formación ósea resultó comparable en todos los grupos de tratamiento, a saber, la nueva formación ósea estuvo en contacto directo con las partículas de CaP. Esto indica que los vehículos libres de agua que se evaluaron no interfieren con la nueva formación ósea. Además, no se observaron restos de vehículos residuales, lo que indica que estas formulaciones libres de agua se desintegran fácilmente *in vivo*, según se observó *in vitro* previamente. En resumen, estos resultados respaldan la conclusión de que estos vehículos libres de agua son útiles para suministrar materiales de CaP osteoinductivos para la reparación de defectos óseos.

Ejemplo 4: Formulación de masillas osteoinductivas libres de agua

15 Se seleccionó una variedad de componentes de materiales tanto naturales como sintéticos para construir vehículos moldeables, libres de agua, biocompatibles, con características de manejo que pueden ajustarse y cinética de degradación específica. Se categorizan, de manera general, ya sea como disolventes o espesantes:

Disolventes

- 20 – Polietilenglicol, mw= 400 (Merck) ("PEG400")
- Glicerol (Sigma) ("Gly")

Espesantes:

- 25 – Polietilenglicol, mw= 4,000 (Fluka) ("PEG4k")
- Dextrano, mw= 40,000 (Pharmacosmos) ("Dex")
- Xanthan XGF FNHV (Jungbunzlauer) ("Xan")
- 30 – Blanose® sodio carboximetilcelulosa, 7H4XF PH (Hercules) ("CMC7H")
- Almidón, soluble (Sigma)
- 35 – Lecitina de soja (AMD)
- Pluronic® F88 (BASF) ("F88")
- Solutol® HS 15 (BASF) ("HS15")

45 Se prepararon múltiples formulaciones usando diferentes combinaciones de estos componentes para desarrollar vehículos moldeables con diferente rigidez, homogeneidad y viscosidad definidas. Las formulaciones se realizaron de acuerdo con el siguiente procedimiento general: los disolventes y los espesantes se midieron por volumen y masa, respectivamente, y se mezclaron luego hasta alcanzar la homogeneidad.

50 Las formulaciones de vehículos útiles como aglutinantes de partículas moldeables se combinaron luego con partículas de TCP (500-1000 µm). Tales formulaciones de vehículos son, por ejemplo: xantano, dextrano, almidón y glicerol (XDS); CMC7H, PEG4k, PEG400, y glicerol (CMC/PEG); lecitina de soja y F88 (SLF88); y xantano, dextrano y Solutol® HS 15 (XDHS). Los vehículos y las partículas de TCP se mezclaron hasta alcanzar la homogeneidad en relaciones volumétricas que varían de 1:2 a 3:4, vehículo a partículas. Estos se evaluaron luego como masillas cerámicas moldeables y se puntuaron según sus características de manejo, de manera específica, cohesión, adherencia y ductilidad.

55 Para evaluar la cinética de disolución de estas masillas, por ejemplo: XDS, CMC/PEG y SLF88, estas se sumergieron en PBS a 37 °C (1:10 v/v) y se monitorearon visualmente en cuanto a disolución como en el Ejemplo 2.

Resultados

60 En conjunto, las características de manejo y los datos de disolución proporcionaron una base para refinar el cuerpo de los vehículos libres de agua que se desarrollaron solo para obtener aquellos que cumplían con los requisitos deseados, que son, por ejemplo, capacidad de moldeo y solubilidad en agua en 2 días (Tabla 3).

Tabla 3: Resumen de materiales cerámicos moldeables libres de agua seleccionados

Formulaciones de masilla	Composición		Disolución completa	Características
	Disolvente	Espesante		
XDS	Gly	60% Dex, 10% Almidón, 2,5% Xan (p/v)	<2 horas	Dúctil, cohesivo, moldeable, pegajoso
CMC/PEG	PEG400, Gly (1:1, v/v)	15% CMC7H, 25% PEG 4k (p/v)	<21 horas	Cohesivo, dúctil, moldeable, altamente
SLF88	Lecitina de soja	50% F88 (p/w)	<21 horas	Moldeable
XDHS	HS 15, Gly (1:9, v/v)	2,5% Xan, 70% Dex (p/v)	<18 horas	Dúctil, cohesivo, moldeable

Análisis

5 Usando una amplia variedad de componentes según se enumeran en la Tabla 3, se desarrollaron masillas osteoinductivas moldeables, por ejemplo, XDS (xantano, dextrano, almidón y glicerol), CMC/PEG (CMC, PEG 400, PEG 4k y glicerol), SLF88 (lecitina de soja y Plu F88) y XDHS con características de manejo personalizadas para disolverse en dos días. Al ser libres de agua, estas masillas proporcionan una vida útil prolongada sin originar degradación hidrolítica de las partículas de TCP.

10 Ejemplo 5: Formulación de inyectables osteoinductivos libres de agua

Se seleccionó una variedad de componentes de material tanto natural como sintético para construir vehículos inyectables, libres de agua, biocompatibles con características de manejo deseadas y cinética de degradación específica:

- CeKol 50000 carboximetilcelulosa (CP Kelco) ("CMC50k")
- Glicerol (Sigma) ("Gly")
- Lutrol® F 127 (BASF) ("F127")
- Solutol® HS 15 (BASF) ("HS15")
- Xanthan XGF FNHV (Jungbunzlauer) ("Xan")

Se prepararon múltiples formulaciones usando una combinación de los diferentes componentes para desarrollar vehículos inyectables con rigidez, homogeneidad y viscosidad óptimas para extrusión a través de una jeringa con punta luer. Las formulaciones se realizaron siguiendo el mismo procedimiento general: las cantidades de los componentes se midieron por volumen o masa y luego se combinaron hasta que se alcanzó homogeneidad.

Estas formulaciones de vehículo útiles como aglutinantes de partículas inyectables se combinaron luego con partículas de TCP (150-500 µm). Por ejemplo, tales formulaciones de vehículo comprenden xantano y glicerol (XG); F127 y HS15 (HSF); CMC50k y glicerol (CMCG); y xantano, Solutol® HS 15 y glicerol (XHS). Los vehículos y las partículas de TCP se mezclaron hasta que se alcanzó homogeneidad en las relaciones volumétricas que varían desde 0,6:1 a 1:1, vehículo a partículas, y se transfirieron luego a una variedad de jeringas con punta luer. Los aglutinantes de partículas inyectables se evaluaron luego sobre la base de sus características de manejo, por ejemplo, cohesión, adherencia y facilidad de extrusión.

40 Para evaluar sus características de disolución, estas masillas, por ejemplo: XG, HSF y CMCG, se sumergieron en PBS a 37 °C (1:10 v/v) y se monitorearon visualmente en cuanto a la disolución como en el Ejemplo 2.

Resultados

45 En conjunto, las características de manejo y los datos de disolución proporcionaron una base para refinar el cuerpo de los vehículos libres de agua que se desarrollaron solo para obtener aquellos que cumplieran con los requisitos deseados, por ejemplo: capacidad de inyección y solubilidad en agua en de dos días. Estas formulaciones se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen de materiales cerámicos inyectables libres de agua

Formulaciones inyectables	Composición	Disolución completa	Características
XG	1% Xan, Gly (p/v)	<1 h	Fluido, pegajoso
HSF	42% F127, 58% HS15 (p/w)	<5 h	Fluido, pegajoso
CMCG	5% CMC, Gly (p/w)	<1 h	Fluido
XHS	HS 15, Gly 1% Xan (2:3, v/v) (p/v)	<12 h	Fluido, moldeable, pegajoso

Análisis

5 Utilizando una variedad de componentes enumerados en la Tabla 4, se desarrollaron inyectables osteoinductivos, por ejemplo, XG (xantano y glicerol), HSF (Solutol® HS 15 y Plu F127), CMCG (CMC y glicerol) y XHS (xantano, Solutol® HS 15 y glicerol) con características de manejo personalizadas para disolverse en dos días. Al ser libres de agua, estos inyectables proporcionan una vida útil prolongada sin degradación hidrolítica de las partículas de TCP.

Ejemplo 6: Formación ósea *in vivo* de masillas e inyectables osteoinductivos libres de agua

10 Se implantaron materiales osteoinductivos libres de agua en la forma de masilla o inyectable que contienen partículas de TCP (descritas previamente en los ejemplos 4 y 5) en 8 perros machos para evaluar su potencial de formación ósea *in vivo*. Los materiales se implantaron tanto en sitios óseos como no óseos: los músculos femoral y paraespinal, respectivamente. Los defectos femorales de 5 mm de diámetro se rellenaron con menos de 0,5 cc de muestra de prueba de material y se implantaron muestras de 1 cc en el músculo. Las partículas de fosfato tricálcico (TCP) (500-1000 y 150-500 µm) solo se implantaron como control. Los implantes se recolectaron después de 12 semanas y se prepararon para evaluación histológica. Las muestras de prueba se tiñeron con azul de metileno y fucsina para visualizar la formación ósea.

20 De manera adicional, las formulaciones de vehículo se evaluaron en el tiempo requerido para la disolución completa en solución salina regulada con fosfato (PBS), análoga al fluido fisiológico del cuerpo. Una de las muestras en cc de cada formulación de vehículo, sin gránulos de fosfato de calcio, se sumergió en 8 cc de PBS y se almacenó a 37 °C. Las muestras se monitorearon visualmente en cuanto a la disolución completa, que se define en la presente como cuando una forma aparente, forma o fragmento del vehículo no perceptible resulta visible en PBS y la mezcla vehículo-PBS es visiblemente homogénea. Se registró el tiempo para la disolución completa.

Tabla 5: Resumen de implantes para defecto femoral

Formulación	Vehículo:TCP (v/v)	Tamaño de partícula de TCP (µm)	Forma
XDS (Ejemplo 4)	2:3	500-1000	Masilla
CMC/PEG (Ejemplo 4)	2:3	500-1000	Masilla
SLF88 (Ejemplo 4)	2:3	500-1000	Masilla
HSF (Ejemplo 50)	1:1	150-500	Inyectable
CMCG (Ejemplo 5)	1:1	150-500	Inyectable

Tabla 6: Resumen de implantes intramusculares

Formulación	Vehículo:TCP (v/v)	Tamaño de partícula de TCP (µm)	Forma
XDS (Ejemplo 4)	2:3	500-1000	Masilla
CMC/PEG (Ejemplo 4)	2:3	500-1000	Masilla

(continuación)

Formulación	Vehículo:TCP (v/v)	Tamaño de partícula de TCP (μm)	Forma
XG (Ejemplo 5)	1:1	150-500	Inyectable
HSF (Ejemplo 5)	1:1	150-500	Inyectable
CMCG (Ejemplo 5)	1:1	150-500	Inyectable

Resultados

5 La tinción histológica de los implantes femorales (Figura 4a)) muestra que las partículas de TCP se mantuvieron gracias a los vehículos libres de agua en los defectos, según lo previsto. Además, la regeneración ósea extensa fue evidente en todos los defectos. En particular, no se observó material vehículo residual en ninguna de las secciones de implante examinadas.

10 La tinción de los implantes intramusculares (Figura 4b)) demuestra el mantenimiento de osteoinductividad de los gránulos de TCP comprendidos en vehículos libres de agua, según se evidencia mediante la formación ósea ectópica en el músculo (CMCG que se representa como un ejemplo) en todas las formulaciones a excepción de SLF88.

15 Las pruebas de disolución *in vitro* de los vehículos solos mostraron que SLF88 fue el único vehículo que no se disolvió por completo en dos días *in vitro*.

Análisis

20 Los resultados de este estudio demuestran la utilidad y la eficacia de aplicar vehículos libres de agua, tales como los que se desarrollan en la presente para el suministro de cerámicas osteoinductivas. Estos vehículos pueden suministrar fácilmente materiales cerámicos al sitio del defecto y mantenerlos *in situ* para una reparación ósea óptima. En particular, los datos de disolución *in vitro* ilustraron una relación importante entre el potencial de formación ósea y el tiempo de disolución *in vitro* de los vehículos que se usan en masillas osteoinductivas. De manera específica, se prefieren los vehículos libres de agua de disolución rápida con respecto a los vehículos de disolución lenta, ya que la disolución lenta puede inhibir la osteoinducción de las partículas microestructuradas de fosfato de calcio comprendidas. Sin embargo, un vehículo de disolución lenta (por ejemplo, SLF88) puede "ajustarse" para que se disuelva rápidamente mediante la modificación de la composición química del vehículo (por ejemplo, concentración, peso molecular), temperatura de curado (por ejemplo, curado a 60 °C en lugar de a 98,5 °C) y tiempo de curado (por ejemplo, 45 min en lugar de 90 min).

25

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un material cerámico moldeable, maleable, amasable y/o inyectable que comprende fosfato de calcio poroso que tiene un tamaño de cristal de entre 0,1 y 1,5 μm y una microestructura superficial, en particular una microporosidad superficial, y un vehículo libre de agua, que es un carbohidrato que se selecciona a partir del grupo que consiste en sacáridos, CMC, hidroxietilcelulosa, alginatos, quitosano, dextrano, guar, glucosa, sacarosa, sorbitol, manitol, fructosa, pectina, almidón, xantano, xilano y manano, una proteína que se selecciona a partir del grupo que consiste en fibrina, gelatina y colágeno, un lípido que se selecciona a partir del grupo que consiste en ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, lípidos de esteroides, lípidos prenol, sacarolípidos y lecitina de soja, un poliol que se selecciona a partir del grupo que consiste en glicerol, 1,2-propilenglicol, 1,3-propilenglicol, butilenglicol y hexilenglicol, un polímero orgánico sintético que se selecciona a partir del grupo que consiste en un polietilenglicol, un poloxámero que incluye P65, P84, P85, F87, F88, F98 y F127, y un tensioactivo/emulsionante que es polietilenglicol-660-12-hidroxiestearato, o una combinación o mezcla de estos, en el que el fosfato de calcio comprende macroporos y microporos, en el que los macroporos se encuentran interconectados y los microporos se presentan en la superficie de los macroporos.
- 10 2. El material cerámico de la reivindicación 1, que es osteoinductivo.
- 20 3. El material cerámico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el vehículo libre de agua se desintegra, in vivo, en 6 semanas, preferiblemente en 3 semanas después de la administración.
- 25 4. El material cerámico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el vehículo libre de agua tiene un tiempo de disolución en solución salina fisiológica, in vitro, a 37 °C en una semana, preferiblemente en 3 días, y más preferiblemente en un día.
- 30 5. El material cerámico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el vehículo libre de agua comprende un polímero que tiene una Vida de Estabilidad Dimensional de, como máximo, una semana, preferiblemente, como máximo, 3 días, y más preferiblemente, como máximo, un día.
- 35 6. El material cerámico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el vehículo libre de agua comprende el poloxámero que se selecciona a partir del grupo que consiste en P84, P85, F87, F88; el PEG que se selecciona a partir del grupo que consiste en PEG400, PEG 1000, PEG4000; el lípido que es lecitina de soja; el polisacárido que se selecciona a partir del grupo que consiste en xantano, dextrano, almidón, CMC; el poliol que es glicerol; y el tensioactivo/emulsionante que es polietilenglicol-660-12-hidroxiestearato, o una mezcla o una combinación de estos.
- 40 7. El material cerámico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fosfato de calcio poroso tiene una porosidad total del 20 al 90%, en el que se presentan macroporos que tienen un tamaño de 0,1 a 1,5 mm, y en el que se presentan microporos en la superficie de los macroporos, teniendo dichos microporos un tamaño de 0,05 a 20 μm .
- 45 8. El material de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que tiene un tamaño de grano promedio en un rango de 0,1-1,50 μm , una porosidad que comprende microporos en un rango de tamaño de 0,1-1,50 μm , y que tiene un porcentaje de área superficial de microporos en un rango del 10-40%.
- 50 9. El material de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en la promoción de la formación ósea en un sujeto que así lo necesita, en el que el vehículo libre de agua es un auxiliar de procesamiento que tiene una solubilidad adecuada en agua o un regulador fisiológico a una temperatura corporal humana (37 °C) de manera tal que comienza a desintegrarse después de la introducción en el cuerpo del sujeto y antes del inicio de la acción osteoinductiva del material.
- 55 10. El material para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el vehículo libre de agua se disuelve o disocia sustancialmente por completo antes de que se complete la formación ósea.
- 60 11. El material para uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, en el que el vehículo libre de agua se disuelve o disocia sustancialmente por completo antes del inicio de la formación ósea.
12. El material para uso de acuerdo con las reivindicaciones 9, 10 u 11, en el que el vehículo libre de agua comprende una composición libre de agua que permite el almacenamiento de vida útil prolongada de masillas premezcladas.

Figura 1

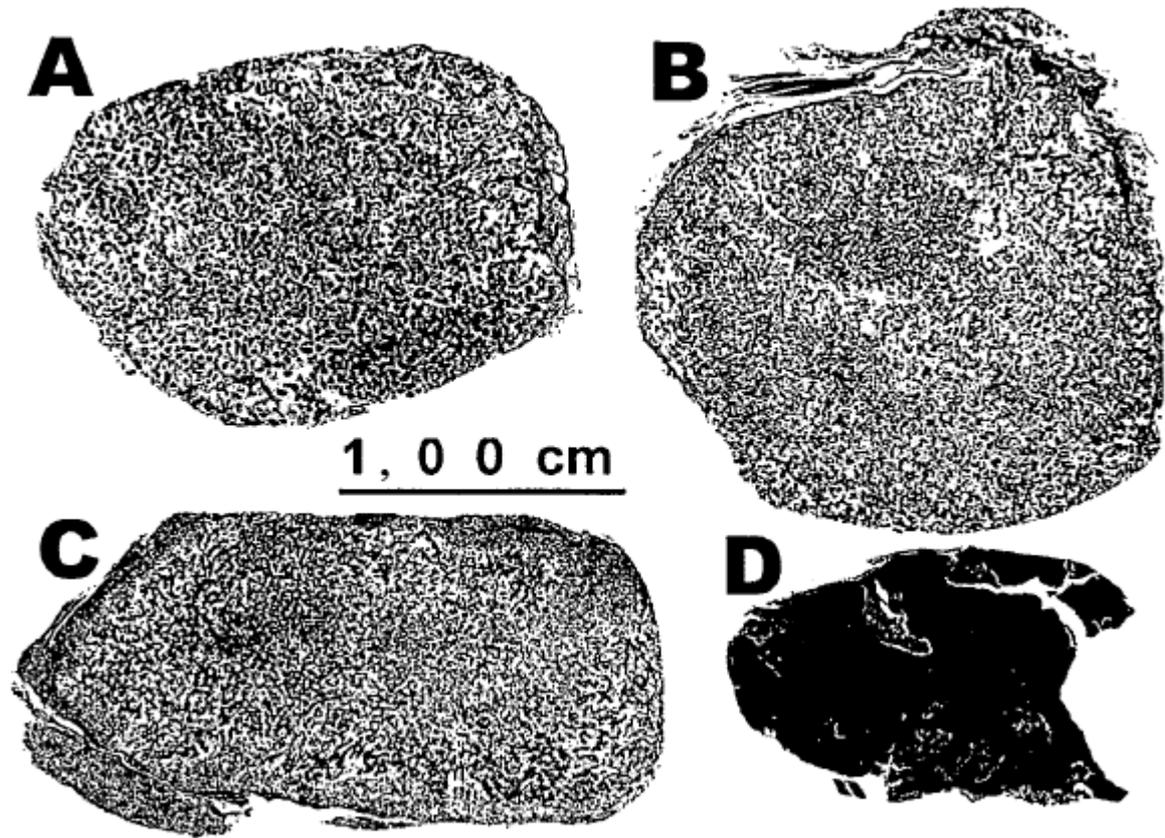
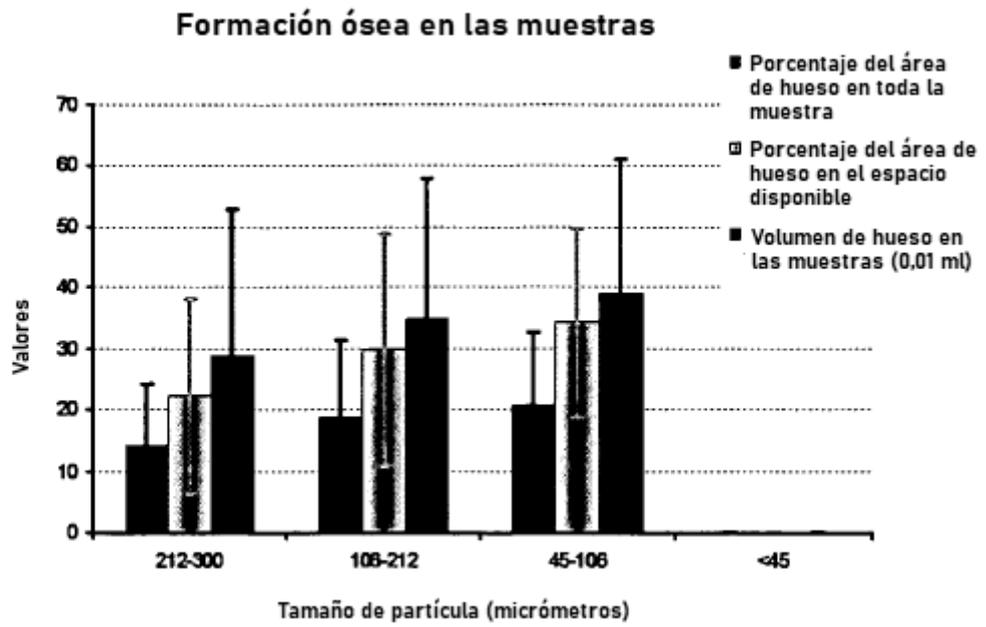


Figura 2



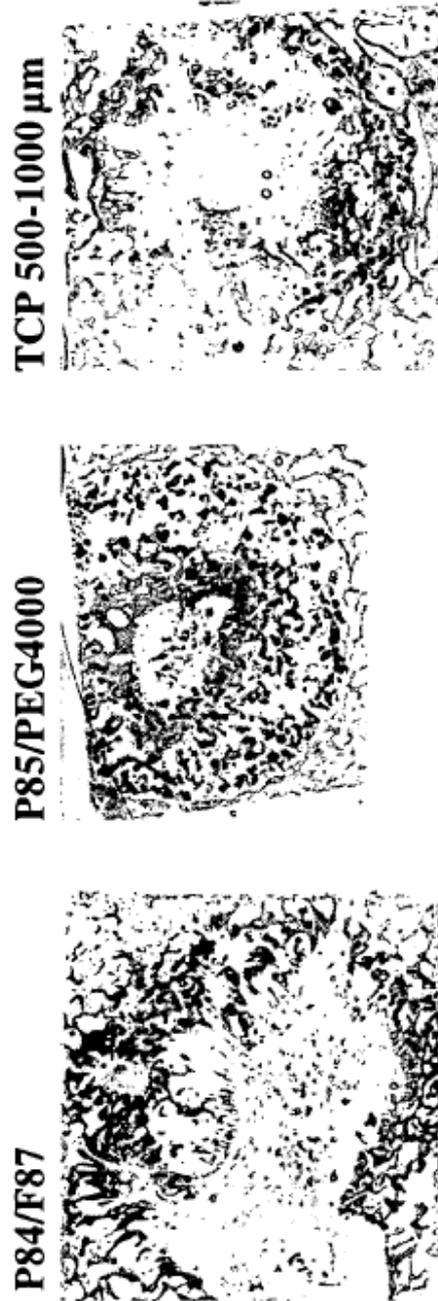


Figura 3

Figura 4 a)

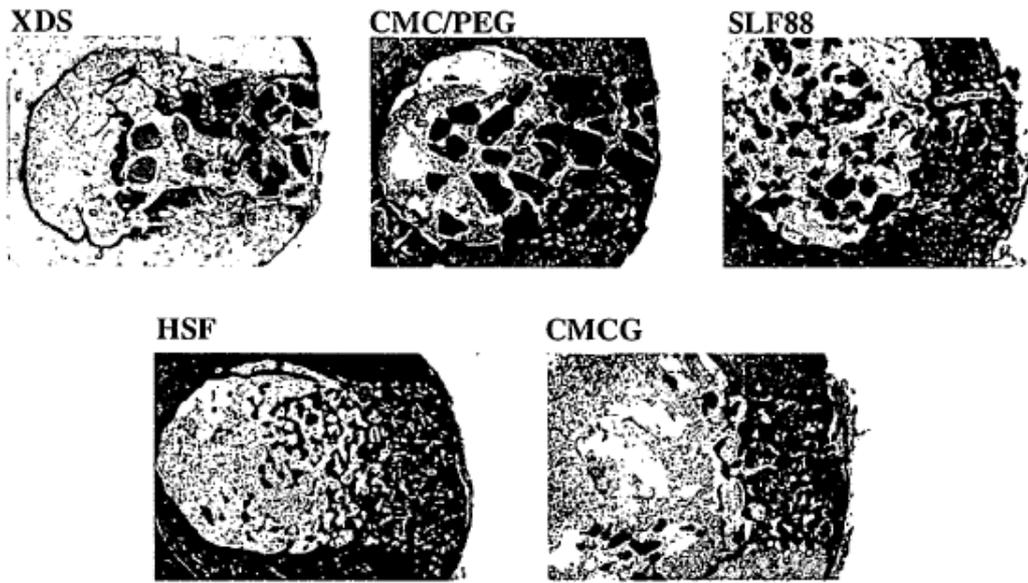


Figura 4 b)

