

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 537**

51 Int. Cl.:

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/46 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2016 PCT/NL2016/050182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16144182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2016 E 16718512 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3268058**

54 Título: **Materiales compuestos biocompatibles anhidros**

30 Prioridad:

12.03.2015 NL 2014446

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

04.03.2021

73 Titular/es:

**KUROS BIOSCIENCES B.V. (100.0%)
Prof. Bronkhorstlaan 10 G 48
3723 MB Bilthoven, NL**

72 Inventor/es:

**DE GROOT-BARRERE, FLORENCE;
BARBIERI, DAVIDE;
GRIJPMMA, DIRK WYBE y
DE BRUIJN, JOOST**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 809 537 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

Materiales compuestos biocompatibles anhidros

5 La invención está dirigida a materiales compuestos biocompatibles para aplicaciones médicas tales como la regeneración de tejidos. En particular, la presente invención está dirigida a materiales compuestos biocompatibles que pueden usarse para el tratamiento de la pérdida ósea o defectos óseos.

10 Los métodos para la regeneración de tejidos se basan principalmente en autoinjerto y aloinjerto de tejidos de donantes *es decir* tejidos de donantes naturales. En los métodos de regeneración ósea basados en autoinjerto, el hueso del propio paciente se coloca en el sitio de pérdida o defecto óseo. Las desventajas de esta técnica son una morbilidad significativa en el sitio del donante y/o el dolor en el sitio de extracción del hueso de reemplazo. Además, la cantidad de hueso de autoinjerto disponible es limitada. Las alternativas biológicas a los autoinjertos incluyen el aloinjerto (hueso tomado de un sujeto donante o animal, *es decir* xenoinjerto), matriz ósea desmineralizada (DBM), factores de crecimiento (por ejemplo, proteínas morfogenéticas óseas, BMP), o productos basados en células. Los inconvenientes de los métodos derivados del hueso son el riesgo de transferencia de enfermedades y/o la respuesta inmunitaria y los altos costos del uso de DBM y BMP.

20 Han surgido métodos alternativos para reemplazar los métodos mencionados anteriormente que se basan en injertos óseos naturales. Estos métodos alternativos, típicamente, usan materiales sintéticos granulares (por ejemplo, biocristales, cerámicas, polímeros), por ejemplo, cerámicas que comprenden fosfato de calcio (CaP). Estos materiales sintéticos granulares son generalmente bioactivos. Esto significa que soportan el tejido recién formado mediante el aprovisionamiento de una armazón de soporte y guía, comprenden y proporcionan material de alimentación esencial para el tejido nuevo y/o incluso estimulan la formación de tejido nuevo. En el campo de la reparación ósea, esta actividad biológica se conoce, además, como osteoconducción y, en casos específicos, osteoinducción.

30 El material sintético granular que es osteoconductor significa que el hueso recién formado será guiado por el material sintético granular que actúa como un andamio para el crecimiento óseo. Para que ocurra la osteoconducción, los osteoblastos usan el material sintético como una armazón para crecer y formar hueso nuevo.

35 El material sintético granular que es osteoinductor significa que el material sintético granular estimula la formación de hueso nuevo, incluso en lugares donde no hay hueso natural presente para proporcionar los osteoblastos. La osteoinducción implica la diferenciación de células osteoprogenitoras en osteoblastos. Estos osteoblastos pueden formar hueso nuevo mediante el uso del material sintético granular como una armazón para el crecimiento óseo como se explicó anteriormente.

40 Para la aplicación de estos materiales sintéticos granulares, es importante que se coloquen en el sitio de la pérdida o defecto óseo y permanezcan en su lugar para que el hueso crezca dentro del material sintético granular. Esto se logra, típicamente, mediante el uso de un material polimérico como un portador del material sintético granular. Los portadores se denominan, además, aglutinantes. Para retener las propiedades de reconstrucción del material sintético granular, es importante que el material polimérico se degrade rápidamente en el sitio de la aplicación. Por lo tanto, el material polimérico es, preferentemente, un material polimérico biodegradable.

45 Generalmente, se acepta que las propiedades de reconstrucción ósea del material sintético granular probablemente se originan en la micro y submicroestructura de la superficie del material sintético. Se conoce que determinados materiales sintéticos granulares que comprenden CaP con estructuras específicas de micro y submicrosuperficie tienen, además, propiedades osteoinductoras. Se conoce además, que las condiciones acuosas prolongadas pueden afectar la micro y submicroestructura de la superficie del material y que pueden perderse las propiedades de reconstrucción de los materiales sintéticos granulares. Por lo tanto, para las propiedades reconstructivas del material sintético granular es importante que su estructura superficial permanezca intacta durante, por ejemplo, el almacenamiento del material. Por lo tanto, se prefiere que la composición de material sintético granular y material polimérico biodegradable sea anhidra. Cuando el material polimérico biodegradable es anhidro, una composición del material polimérico biodegradable y el material sintético granular puede almacenarse juntos durante períodos más largos sin perder la eficacia del material sintético granular.

55 El documento EP-A-0714666 describe una composición de material sintético y un portador polimérico en donde el portador polimérico es un copolímero (*es decir* un polímero basado en más de un tipo de monómero) de los monómeros ϵ -caprolactona y glicólico. Los inconvenientes de estos copolímeros son que no muestran la velocidad de degradación deseada. Por lo tanto, el portador es menos adecuado para, por ejemplo, la osteoinducción. Además, estos tipos de polímeros solo pueden esterilizarse mediante métodos distintos a la irradiación con rayos gamma o por haz de electrones porque los copolímeros se degradan con la irradiación, lo que hace que el material del copolímero no sea adecuado como un portador. Esto se hace evidente a partir de, *entre otros*, el documento EP-A-0050215 en donde copolímeros similares de hecho se degradan intencionadamente por irradiación.

65 El documento WO 2011/009635 describe una composición de material sintético y un portador que comprende un homopolímero biodegradable (*es decir* un polímero basado en un tipo de monómero) tales como el polioxámero y los

5 polisacáridos. Sin embargo, estos homopolímeros, además, resisten condiciones de esterilización no irradiadas. Se conoce, por ejemplo, para el polietilenglicol que la irradiación con rayos gamma resulta en la reticulación de los polímeros que, de esta manera afecta las propiedades del material, que lo hace inadecuado para actuar como portador. Además, se conoce que los polisacáridos tales como la carboximetilcelulosa se oxidan por irradiación, lo que resulta, además, en propiedades modificadas del material.

10 Kato y otros, Biomaterials 27 (2006) 3927-3999 describe una masilla de un copolímero de bloque de poli(ácido láctico) (PLA) con p-dioxanona (DX) y poli(etilenglicol) (PEG) insertados aleatoriamente en combinación con polvo de fosfato beta-tricálcico (β -TCP) y rhBMP-2. Sin embargo, un inconveniente de estos materiales compuestos es que se conoce que este copolímero de bloque retiene >90 % de su masa original hasta el día 10 (ver *por ejemplo* Saito y otros, Nature Biotechnology 19 (2001) 332-335).

15 Hoshino y otros, Journal Orthopaedic Research (2770) 1042-1051 describen una masilla de un copolímero de bloque de PLA y PEG con β -TCP y rhBMP-2. Sin embargo, el copolímero de bloque usado no tiene la velocidad de biodegradación conveniente y tiene características de manipulación menos favorables.

20 Xavier Garric y otros, Journal of Biomaterials Science 23 (2012) 1687-1700 describen el potencial de un Andamio Basado en PLA-PEO-PLA para la Ingeniería de Tejidos de Piel. En el documento WO 2006/014607, se describen dispositivos médicos que contienen copolímero de bloque resistente a la irradiación.

Es conveniente tener un material polimérico biodegradable que actúe como portador de material sintético granular en condiciones anhidras, que sea resistente a la irradiación gamma y que muestre las propiedades mecánicas y la velocidad de biodegradación convenientes.

25 Los presentes inventores encontraron sorprendentemente un material polimérico biodegradable que reúne estos requisitos.

La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con propósitos informativos.

30 La presente invención es un material compuesto biocompatible anhidro que comprende un material polimérico biodegradable y un material sintético granular, en donde el material polimérico consiste esencialmente en al menos un copolímero de bloque, en donde al menos un copolímero de bloque es un polímero de acuerdo con la fórmula (I)



en donde;

40 A y B son, independientemente, óxido de metileno, óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de butileno, o dioxanona, preferentemente, óxido de etileno u óxido de propileno;

X es una unidad de poliamida, poliéster, poliuretano, policarbonato o poliéster, preferentemente una unidad de poliéster, con mayor preferencia hidroxibutirato, ácido láctico, glicólido, γ -butirolactona, δ -valerolactona o ϵ -caprolactona, con la máxima preferencia ácido láctico;

45 l es 0 o 1, preferentemente 0;

m es 1 a 25;

50 n es m o 0;

p es 2 a 150;

q es 0 a 100; y

55 l + n es más que 0.

En la representación de la fórmula (I), A_p y B_q son bloques hidrófilos y X_n y X_m son bloques hidrófobos. El copolímero de bloque de la presente invención comprende, por lo tanto, al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo.

60 El término consistente esencialmente significa que el material polimérico consiste, típicamente, en al menos 90 % en peso, con mayor preferencia al menos 95 % en peso, con la máxima preferencia al menos 99 % en peso de uno o más de dichos copolímeros de bloques.

65 En aras de la concisión, el material compuesto biocompatible anhidro en la presente descripción se denomina, además, material compuesto. El material sintético granular en la presente descripción se denomina, además, como gránulos.

Material sintético granular

El material compuesto biocompatible anhidro de acuerdo con la presente invención se aplica como un medicamento en, por ejemplo, el campo de la reparación de tejidos. El material compuesto puede aplicarse particularmente para el tratamiento de pérdida o defectos de tejido conectivo y/u óseos.

Preferentemente, el material sintético granular es osteoconductor. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que el material polimérico es particularmente adecuado para combinarse con material sintético granular osteoconductor porque el material polimérico, *entre otras cosas*, debido a sus propiedades de biodegradación, no inhibe la regeneración ósea y la osteoinducción.

En una modalidad preferida adicional, el material compuesto biocompatible anhidro es osteoinductor. Esto significa que el material compuesto biocompatible anhidro comprende uno o más materiales que son osteoinductores. Las propiedades osteoinductoras del material compuesto biocompatible anhidro pueden lograrse, por ejemplo, mediante la adición de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y/u otros factores de crecimiento. Aún en una modalidad más preferida, el material sintético granular es intrínsecamente osteoinductor. Esto significa que el material sintético granular en sí mismo estimula la formación de osteoblastos y, por lo tanto, la formación de hueso nuevo incluso en entornos no óseos (por ejemplo, cerámica osteoinductora, matriz ósea desmineralizada-DBM).

El documento WO 2015/009154 describe materiales sintéticos granulares basados en fosfato de calcio CaP que son osteoinductores. Se descubrió que, en particular, el material polimérico biodegradable de la presente invención es adecuado para mantener las propiedades osteoinductoras de los materiales sintéticos granulares como se describió en el documento WO 2015/009154.

El material sintético granular de acuerdo con la presente invención puede comprender fosfato de calcio, vidrio bioactivo y similares. Rahaman y otros, Acta Biomaterialia 2011(6)2355-2373 revisa una diversidad de materiales sintéticos para la ingeniería de tejidos que son adecuados para la presente invención. Los materiales sintéticos granulares pueden ser material cerámico granular. Preferentemente, el material sintético granular comprende fosfato de calcio. Tales materiales sintéticos granulares han demostrado ser particularmente adecuados para la regeneración de tejidos.

Las propiedades osteoinductoras de determinados materiales sintéticos granulares se atribuyen comúnmente a su estructura de micro y submicrosuperficie específicas. El agua puede afectar esta estructura y de esta manera afectar las propiedades osteoinductoras del material sintético granular. Además, otras propiedades del material sintético granular pueden afectarse por la presencia de agua porque los materiales sintéticos pueden ser, por ejemplo, parcialmente disueltos por el agua. Además, se conoce que el agua también puede afectar el potencial osteoinductor de otros agentes, *es decir* BMP y DBM. Por lo tanto, el material compuesto biocompatible es anhidro para prevenir o limitar la reducción de *por ejemplo* las propiedades osteoconductoras y osteoinductoras. Por lo tanto, anhidro en la presente invención significa que el material sintético granular del entorno es suficientemente anhidro para que el material sintético granular retenga suficientemente las propiedades químicas y estructurales para limitar la reducción de la actividad biológica del material sintético granular de manera que el material compuesto biocompatible permanezca eficaz y por lo tanto, pueda aplicarse. Esto es contrario a, por ejemplo, los hidrogeles que además pueden formarse con el material polimérico de la presente invención.

Material polimérico biodegradable

El material polimérico biodegradable de acuerdo con la presente invención se degrada bajo condiciones fisiológicas en, preferentemente, menos de 48 horas. De Davison N.L. y otros, (Acta Biomaterialia, 2012 July; 8(7): 2759-2769) y Barbieri D, y otros, (Acta Biomaterialia, 2011 May;7(5): 2007-2014) se conoce que las propiedades osteoinductoras del material sintético granular no se pierden si el material polimérico biodegradable se degrada dentro de 48 horas. Además, para la osteoconducción se prefiere que el material polimérico se degrade dentro de 48 horas. Para el material compuesto, el material polimérico biodegradable, típicamente, llena los huecos entre el material sintético granular y los huecos dentro de los gránulos que son el resultado de la micro y submicroestructura del material. Para el propósito de la regeneración ósea, es esencial que, por ejemplo, los osteoblastos y las células osteoprogenitoras, pero también las células sanguíneas y otras células que se requieren para la regeneración ósea puedan penetrar dichos huecos para formar la nueva estructura ósea. Si la degradación ocurre dentro de una hora, puede que no haya tiempo suficiente para aplicar el material compuesto biocompatible anhidro en el sitio de tratamiento, que es, típicamente, un ambiente húmedo. Por lo tanto, con mayor preferencia, el material polimérico se degrada en más de 10 minutos, con la máxima preferencia en un tiempo entre 1/4 hora y 48 horas.

La biodegradación del material polimérico significa que el material polimérico se degrada, desintegra, reabsorbe y/o disuelve en el sitio de aplicación de manera que no impida la eficacia del material sintético granular. El mecanismo preciso de biodegradación, por ejemplo, si las bacterias, células y/o enzimas están involucradas o no, es irrelevante. La biodegradación, por ejemplo, puede ocurrir simplemente en presencia de agua. El tiempo requerido para la degradación puede determinarse mediante un ensayo en donde el material compuesto de acuerdo con la presente invención se sumerge en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) u otra solución isotónica equivalente a una temperatura de

aproximadamente 37 °C sin agitación. La biodegradación del material compuesto puede controlarse mediante inspección visual.

5 El material compuesto biocompatible anhidro de acuerdo con la presente invención es, preferentemente, una masilla no adhesiva inyectable, maleable y/o amasable que retiene su forma a una temperatura típica de 15 a 40 °C. Tal masilla es particularmente ventajosa cuando el material compuesto se usa para la reparación ósea. Las propiedades físicas del material compuesto pueden determinarse sometiendo el material compuesto en una prueba a ciegas, que puede implicar una puntuación del material compuesto de acuerdo con los parámetros establecidos en la Tabla 1. La prueba a ciegas se realiza, típicamente, por tres o más expertos y para cada persona la puntuación final (FS) se calcula como FS=M+R+H+S+O+RG. Preferentemente, la Puntuación Final es mayor que 15, con mayor preferencia mayor que 20, con la máxima preferencia mayor que 22. Cuando más de una persona realiza la prueba, se calcula el promedio de todas las Puntuaciones Finales y se usa para evaluar la masilla. Por lo tanto, se apreciará que cuando más de una persona experta realiza la prueba a ciegas, la Puntuación Final es un promedio de todas las Puntuaciones Finales.

15 **Tabla 1** Puntuación para la prueba a ciegas de masillas inyectables, maleables y/o amasables no adhesivas

Parámetro	Descripción de la puntuación
Moldeabilidad (M): es el material compuesto fácilmente maleable, es decir ¿Se le puede dar alguna forma? Escala 1-5	1 imposible darle forma;
	2 difícil darle forma (por cualquier motivo);
	3 moldeables, pero pueden ser más suaves;
	4 moldeable, bueno;
	5 excelente.
Recuperación (R): después de moldearlo y extenderlo sobre una superficie, ¿puede recuperarse completamente fácilmente? Escala 1-5	1 imposible recuperarlo sin pérdidas;
	2 se recupera con muchas pérdidas;
	3 se recupera con pérdidas mínimas;
	4 se recupera completamente, pero es adhesivo;
	5 se recupera completamente sin ningún problema.
Dureza (H): ¿el material compuesto es suave, duro o un equilibrio intermedio? Escala 1-5	1 una piedra o completamente flojo;
	2 poco deformable, pero o bien muy duro o muy suave;
	3 deformable, con algunas dificultades (por ejemplo un poco adhesivo);
	4 deformable, bueno;
	5 excelente.
Adhesividad (S): ¿el material compuesto es adhesivo en los guantes? Escala 1-5	1 completamente adhesivo;
	2 adhesivo, moldeables con alguna dificultad;
	3 adhesivo, con buena moldeabilidad;
	4 no adhesivo, bueno;
	5 excelente.

	Parámetro	Descripción de la puntuación
5	Oleaginosidad (O): durante la conformación, ¿los guantes se ponen grasosos? Escala 1-5	1 guantes son grasosos pero adhesivos;
		2 guantes son grasosos pero no adhesivos;
		3 grasosos, pero no excesivamente;
10		4 mínimamente grasosos;
		5 no grasosos en absoluto, guantes secos.
15	Gránulos de retención (RG): durante la conformación, ¿se retienen los gránulos en la masilla? Escala 1-5	1 completamente sueltos antes de la conformación;
		2 todos los gránulos se dispersan durante la conformación;
20		3 se pierden muchos gránulos durante la conformación;
		4 se pierden algunos gránulos durante la conformación;
25		5 sin pérdida de gránulos

En otra modalidad de la presente invención, el material compuesto es para usar como un medicamento para el tratamiento de tejido conectivo tal como la piel. Al envejecer el tejido conectivo, típicamente comienza a mostrar flacidez pronunciada, arrugas y/o líneas finas. El material compuesto biocompatible anhidro de la presente solicitud puede ser un relleno dérmico que puede usarse para tratar o prevenir signos de envejecimiento del tejido conectivo. Las propiedades físicas del relleno dérmico pueden ser iguales o diferentes en comparación con la masilla no adhesiva inyectable, maleable y/o amasable. Además del polímero biodegradable, el relleno dérmico puede comprender, además, otros componentes típicamente usados en el tratamiento del tejido conectivo. Ejemplos de estos son los rellenos de colágeno, ácido hialurónico y otros componentes que se encuentran en los rellenos dérmicos conocidos tales como Restylane®, Sculptra® y Rediesse® (M.H. Gold, Clin. Interv. Aging 2007 Sep; 2(3): 369-376).

Se descubrió sorprendentemente que el material polimérico biodegradable que consiste esencialmente en uno o más copolímeros de bloques que comprenden al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo es particularmente resistente a la irradiación γ y a la irradiación del haz de electrones para fines de esterilización. *Entre otras cosas*, esto significa que las propiedades de manipulación del material compuesto (*por ejemplo*, como se determina por la prueba a ciegas de la Tabla 1) no se modificaron significativamente después de la irradiación. Esto representa un fuerte contraste con otros materiales poliméricos que no son basados en copolímeros de bloque, por ejemplo, los descritos en el documento WO 2011/009635. Se conoce que el poli(etilenglicol) (PEG) forma retículos tras la irradiación γ , mientras que, por ejemplo, la polilactida (PLA) y la carboximetilcelulosa (CMC) se desintegran después de la irradiación γ . Las mezclas de PEG y PLA tampoco son enlaces estables después de la irradiación γ . La reticulación y la desintegración típicamente resultan en cambios inaceptables de las propiedades físicas, *por ejemplo*, fragilidad (*por ejemplo*, para los homopolímeros basados en PLA o PEG), ablandamiento o incluso licuefacción del material (*por ejemplo*, para los homopolímeros basados en CMC). Sorprendentemente, un copolímero de bloque de ambos polímeros es capaz de resistir la esterilización mediante irradiación γ y/o irradiación con haz de electrones. Esto es particularmente ventajoso para los materiales compuestos anhidros ya que el método alternativo de esterilización es el tratamiento con vapor. El tratamiento con vapor para la esterilización de los materiales compuestos de acuerdo con la presente solicitud no es preferido porque el material polimérico puede degradarse (parcialmente) por el vapor. Además, el material sintético granular no puede resistir el vapor porque su estructura particular se desintegrará y conducirá a la pérdida de la actividad biológica como se explicó anteriormente en la presente descripción. Por lo tanto, el material sintético granular necesitaría someterse a un procedimiento de esterilización separado.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método para la esterilización de un material polimérico biodegradable de acuerdo con la invención que consiste esencialmente en uno o más copolímeros de bloque que comprenden al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo, en donde el material polimérico biodegradable se irradia por rayos γ y/o haces de electrones mediante el uso de dosis estándar para dispositivos médicos, es decir 10-50 kGy para rayos γ y/o haces de electrones, con mayor preferencia 25-45 kGy.

En otra modalidad, el material compuesto anhidro en su conjunto se esteriliza por irradiación con rayos γ y/o haces de electrones.

El bloque hidrófilo de acuerdo con la presente invención comprende un polioximetileno, poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), politetrahidrofurano, polidioxanona, un poloxámero, o sus combinaciones. Con mayor preferencia, el bloque hidrófilo comprende poli(etilenglicol) o un poloxámero.

5 Cuando se dice que un bloque es hidrófilo, esto significa que el bloque puede ser soluble en agua de manera que pueda eliminarse del sitio de aplicación mediante disolución. Cuando el bloque hidrófilo comprende *por ejemplo*, poli(propilenglicol), politetrahidrofurano y/o polidioxanona, el bloque hidrófilo típicamente comprende, además, polioximetileno y/o poli(etilenglicol) para hacer que el bloque sea hidrófilo, es *decir* soluble en agua. Un poloxámero (es *decir* un poliéter que comprende poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol) es un ejemplo de tal modalidad. Mediante el uso de técnicas experimentales estándar, el experto en la técnica puede determinar fácilmente si el bloque hidrófilo es soluble en agua de acuerdo con la presente invención.

El bloque hidrófobo de acuerdo con la presente invención comprende una poliamida, poliéster, poliuretano, policarbonato o sus combinaciones, preferentemente poliglicólido o polilactida.

15 Los presentes inventores encontraron que los bloques hidrófobos cortos resultan en mejores propiedades físicas del material polimérico. Los Ejemplos de tales propiedades físicas aumentadas son los puntos de fusión más altos (típicamente más de 40 °C), que es beneficioso para fines de almacenamiento, combinado con características cerosas, moldeables, adherentes, así como también una biodegradabilidad de más de 15 minutos y menos de 48 horas.

20 Se obtuvieron resultados particularmente buenos para una modalidad preferida, en donde el copolímero de bloque de acuerdo con la presente invención puede ser un polímero representado por la fórmula (I) como se describió anteriormente, en donde m es 2 a 10, preferentemente 3 a 7; p es 6 a 100, preferentemente 40 a 50; y/o q es 0 a 50, preferentemente 0 a 19.

25 A partir de la fórmula (I) puede apreciarse que los extremos del copolímero de bloque pueden ser bloques hidrófilos (es *decir*, l es 1 y n es 0) o bloques hidrófilos (es *decir*, l es 0 y n es m). Preferentemente, los extremos del polímero son hidrófobos. En tal modalidad, el copolímero de bloque se obtiene, típicamente, proporcionando un polímero hidrófilo B_q - A_p - B_q que después reacciona en una reacción de polimerización con monómeros que forman los bloques hidrófobos X_n y X_m . En el caso de un éster cíclico, esta reacción es, típicamente, una reacción de polimerización por apertura de anillo. Los poliéteres poli(etilenglicol) y poli(propilenglicol) están hechos, típicamente, de los monómeros óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO), respectivamente. En el contexto de la presente invención, los polímeros basados en óxido de etileno y/u óxido de propileno son los mismos que los polímeros basados en etilenglicol y/o propilenglicol, respectivamente.

35 En aras de la claridad y la concisión, A, B y X se definen en la presente descripción y se nombran después del monómero del que están hechos los bloques.

40 En caso de que se use lactida, puede usarse cualquier isómero (es *decir* L-lactida, D-lactida y *meso*-lactida). Preferentemente, la lactida es sustancialmente un isómero, con mayor preferencia sustancialmente D- o L-lactida y con la máxima preferencia sustancialmente L-lactida. Sustancialmente aquí significa que el bloque, típicamente, consiste en más del 90 % en peso, preferentemente, más del 95 % en peso, incluso con mayor preferencia más del 99 % en peso del isómero usado.

45 En una modalidad específica en donde A_p es poli(propilenglicol) y B_q es poli(etilenglicol), la síntesis del copolímero de bloque puede iniciarse por polioxámeros que están disponibles comercialmente. En particular pueden usarse los polioxámeros que se conocen como Pluronic®. Una gran diversidad de polímeros tipo Pluronic® como *por ejemplo*, P65, F127, están disponibles comercialmente. Pluronic® P65 puede, por ejemplo, estar representado por la fórmula $EO_{11}PO_{16}EO_{11}$, mientras que Pluronic® F127 es $EO_{100}PO_{65}EO_{100}$.

50 Como es típicamente el caso en la química de polímeros, el número de unidades de monómero dado es un número promedio del número de monómeros basado en la cantidad de monómeros con los que se realizó la síntesis del polímero. El índice de polidispersidad (PDI) se usa, típicamente, como una medida de la distribución de la masa molecular (y, por lo tanto, también una medida de la distribución del número de monómeros) en una muestra de polímero dada.

55 Se ha encontrado que determinadas propiedades, en particular las propiedades de manipulación de acuerdo con la prueba a ciegas de la Tabla 1 y las propiedades de biodegradación pueden influenciarse por la relación molar de monómeros contenidos en el bloque(s) hidrófobo y monómeros contenidos en el bloque(s) hidrófilo. En caso de que el copolímero de bloque pueda estar representado por la fórmula I, esta relación puede calcularse teóricamente mediante la división de $(n + m)$ sobre $(p + q)$. Si los parámetros n , m , p y q se determinan mediante la cantidad de material con el que se inició la reacción de polimerización, se calcula una relación teórica. Cuando los parámetros n , m , p y q están determinados empíricamente mediante, *por ejemplo*, espectroscopia 1H NMR, puede calcularse una relación real.

60 En la figura 11, se representa la relación entre la relación real L/EO (es *decir* la relación de monómeros de ácido láctico (bloque hidrófobo) sobre monómeros de óxido de etileno (bloque hidrófilo), el intervalo del punto de fusión (T_m), la longitud del PEG y la dureza de la masilla. Esta figura muestra que la relación real influye en las propiedades físicas de la masilla.

Se encontró que, en particular cuando q es 0 y A es óxido de etileno, la relación real es preferentemente menor que 0,36, preferentemente menor que 0,30, con mayor preferencia entre 0,01 y 0,25, incluso con mayor preferencia entre 0,05 y 0,15, aún con mayor preferencia entre 0,08 y 0,12, con la máxima preferencia aproximadamente 0,10. Se apreciará que para los copolímeros de bloque que pueden no estar representados por la fórmula I, las relaciones molares (tanto la relación teórica como la real) pueden calcularse de manera análoga.

La lactida y el ácido láctico se usan en la presente descripción de manera intercambiable para describir los monómeros o bloques de construcción de los bloques de polilactida o poli(ácido láctico) ya que estos bloques son estructuralmente los mismos. Sin embargo, solo el monómero de ácido láctico se usa para calcular la relación de monómeros (*por ejemplo*, L/EO) o el número de monómeros (*por ejemplo*, X_n y X_m en la fórmula I) presente en un bloque y/o copolímero.

En una modalidad adicional de la presente invención, los materiales poliméricos biodegradables comprenden dos o más copolímeros de bloques, cada uno de los cuales comprende al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo. Por lo tanto, puede usarse una mezcla de copolímeros de bloque. Cuando se usa una mezcla de copolímeros de bloque, se entiende que se usan dos o más tipos diferentes de copolímeros de bloque de acuerdo con la presente invención. Estos copolímeros de bloque pueden diferir en masa, relación molar de monómeros y/o tipo de monómeros, etcétera.

Mediante el uso de una mezcla de copolímeros de bloque, es posible optimizar con precisión las propiedades convenientes del material polimérico biodegradable, sin mucho esfuerzo sintético. Se descubrió que además cuando se usaba una mezcla de copolímeros de bloque, la relación molar total de monómeros contenidos en los bloques hidrófobos y monómeros contenidos en los bloques hidrófilos puede usarse para influir en las propiedades del material polimérico biodegradable. En este caso, la relación molar total puede calcularse mediante el uso de las relaciones reales de los copolímeros de bloque individuales como se determina por $^1\text{H NMR}$.

Se prefiere un material polimérico biodegradable que consista esencialmente en una mezcla de dos o más copolímeros en bloque, en particular una mezcla de dos copolímeros de bloque. Este es el caso particular cuando los extremos del polímero son hidrófilos y/o el bloque hidrófilo consiste en poli(etilenglicol). Por ejemplo, para polímeros de acuerdo con la fórmula (I) en donde m es n ; l y q son 0, se prefiere usar una mezcla de dos copolímeros de bloque.

En otra modalidad, el material compuesto biodegradable anhidro comprende, además, uno o más fármacos, por ejemplo, un antibiótico, un agente antiinflamatorio y similares. Tales fármacos pueden ser beneficiosos para el tratamiento de regeneración de tejidos. El fármaco puede incorporarse junto con el material sintético granular en el material polimérico. Una vez que el material polimérico se degrada, se liberan los fármacos.

El material compuesto de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para la osteoinducción. Por lo tanto, un aspecto adicional es un método para tratar la pérdida o defecto óseo, moldeando el material compuesto biocompatible anhidro de acuerdo con la presente invención en una forma conveniente y colocándolo en el sitio de la pérdida o defecto óseo.

La invención puede ilustrarse mediante los siguientes ejemplos y resultados experimentales.

Ejemplo 1

En este ejemplo, se describirá la síntesis y caracterización de un material polimérico particular de acuerdo con la presente invención.

1.1. Síntesis de copolímeros de bloques tribloque de poli(L-lactida)-co-poli(óxido de etileno)-co-poli(L-lactida) (es decir LEOL)

Los copolímeros de bloque LEOL se sintetizaron mediante polimerización por apertura de anillo del monómero de L-lactida en presencia de poli(óxido de etileno) como iniciador y octoato estañoso (SnOct_2) como catalizador. Todas las reacciones se realizaron en atmósfera saturada de argón. El poli(óxido de etileno) (EO) y el monómero de L-lactida se mezclaron en un frasco de vidrio de tres cuellos y se calentaron gradualmente a 130 °C con agitación suave bajo una atmósfera de argón. Posteriormente, se añadieron 4-5 gotas (aproximadamente 160-170 μL) del catalizador y la mezcla se dejó reaccionar a la temperatura de 130 °C y una velocidad de agitación de 50 rpm durante 24 horas. La Tabla 2 muestra los copolímeros de bloque sintetizados.

Tabla 2. Copolímeros de bloque basados en poli(etilenglicol) (LEOL)* relación de bloque utilizada durante la síntesis.

ID del Copolímero	Composición teórica del bloque	Relación mol. L/EO teórica
LL	$\text{L}_{2.5}\text{EO}_{23}\text{L}_{2.5}$	0,22
ML	$\text{L}_5\text{EO}_{46}\text{L}_5$	
HL	$\text{L}_{10}\text{EO}_{91}\text{L}_{10}$	

ID del Copolímero	Composición teórica del bloque	Relación mol. L/EO teórica
HM	L ₁₅ EO ₉₁ L ₁₅	0,33
LH	L ₅ EO ₂₃ L ₅	0,44
MH	L ₁₀ EO ₄₆ L ₁₀	
HH	L ₂₀ EO ₉₁ L ₂₀	
*se usa la nomenclatura XY. La letra X indica la longitud del bloque EO (por ejemplo, L=EO ₂₃ ; M=EO ₄₆ ; H=EO ₉₁) y Y indica la relación mol. del bloque L-ácido láctico/EO (por ejemplo, L=0,22; M=0,33; H=0,44). En donde la relación molar L/EO teórica es la relación teórica como se describió anteriormente en la presente descripción para los monómeros de ácido láctico sobre los monómeros de óxido de etileno.		

1.2. Caracterización de copolímeros de bloques basados en poli(etilenglicol) (LEOL)

1.2.1. Apariencia física (bruta)

Los copolímeros de bloque se analizaron mediante un microscopio estereoscópico para detectar cualquier falla en la homogeneidad no conveniente. Posteriormente, los copolímeros de bloques se caracterizaron primero por su dureza, mediante prensado con herramientas de acero y subsecuentemente mediante la conformación con las manos. La Tabla 3 resume las observaciones.

Tabla 3. Observaciones físicas (manipulación) en copolímeros de bloques basados en poli(etilenglicol) (LEOL).

ID	Observaciones
LL	Masa blanca suave que se derrite tan pronto como se mantiene en las manos dejando una capa adhesiva de polímero.
ML	Masa transparente, gruesa pero maleable. No se derrite tan rápido en las manos como LL: es necesario procesarlo para que se extienda sobre la piel dejando una capa adhesiva de polímero.
HL	Duro y ceroso. Resiste mejor cuando se trabaja con las manos y se suaviza dejando un efecto grasoso.
HM	Muy similar a HL. Se espera que lactida adicional (en comparación con HL) mejore la manipulación y aumente la hidrofobicidad.
LH	Gel extremadamente suave, que inmediatamente se pone líquido una vez que se toca con las manos.
MH	Más duro que el ML (es decir, necesita rasparse) pero se derrite más rápido cuando se trabaja con las manos.
HH	Muy duro y ceroso. Similar a HL.

En base a estas observaciones, parece existir una tendencia en donde un bloque EO más corto resulta en una masa más suave (por ejemplo, LL vs. ML vs. HL).

1.2.2. Punto de fusión: estimación visual

Se puso un volumen de aproximadamente un mL de cada copolímero de bloque en viales de vidrio sumergidos en un baño de agua fría, que se calentó a través de una suave rampa de temperatura. La temperatura del copolímero de bloque se controló continuamente y se registró el intervalo del punto de fusión: la temperatura más baja fue aquella en la que el polímero comenzó a cambiar su estado visualmente, mientras que la temperatura más alta se tomó cuando el polímero se fundió por completo. La Tabla 4 muestra los resultados.

Tabla 4. Intervalo de fusión de copolímeros de bloques basados en poli(etilenglicol) (LEOL).

ID del Copolímero	Intervalo del punto de fusión [°C]	Apariencia después de derretir
LL	30 - 35	Líquido claro
ML	45 - 50	Líquido claro

HL	55 - 60	Líquido claro
HM	40 - 60	Líquido claro
LH	<30	Líquido claro
MH	<40	Líquido claro
HH	<40	Líquido claro

5

10

Los resultados muestran que los copolímeros de bloque LEOL tienen intervalos de temperatura de fusión crecientes con el aumento del tamaño de bloque EO, pero disminuye cuando aumenta el tamaño del bloque de lactida. Por lo tanto, pueden arribarse a algunas conclusiones:

15

- 1) cuanto más corto es el bloque EO, más bajo es el punto de fusión (*por ejemplo*, LL vs. ML vs. HL);
- 2) mientras más largo es el bloque de L-lactida, el punto de fusión es más bajo (*por ejemplo*, LL vs. LH and ML vs. MH).

20

1.2.3. Composición: ¹H-NMR

25

Los copolímeros se disolvieron en cloroformo deuterado (*es decir* CDCl₃, a cualquier concentración) y los espectros (espectros 1 de RMN, *ver más abajo*) se obtuvieron mediante resonancia magnética nuclear de protones (¹H-NMR, 400 MHz) para determinar la composición molecular de cada copolímero. La integración máxima se realizó en espectros sin procesar (*es decir* sin ningún procesamiento) y se registraron el área total del pico del bloque EO (A_{EO}) y el área total de dos picos de bloque de L-lactida (X_L). La composición final del bloque se calculó en base a la fórmula molecular X_nEO_pX_n donde p ∈ {23,46,91}, y mediante el uso de p:A_{EO}=2n:X_L.

30

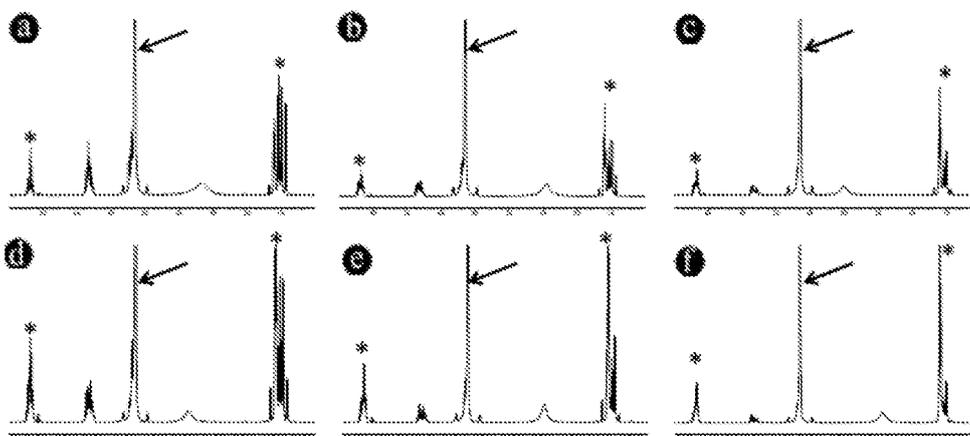
La Tabla 5 compara la composición calculada a partir de las mediciones con las teóricas e informa la relación molecular L/EO real que puede calcularse a partir de la composición por ¹H-NMR: la síntesis completa de copolímeros con mayores cantidades de lactida fue más difícil, lo que condujo a relaciones moleculares L/EO más bajas que las teóricas.

35

40

45

50



Espectros de RMN-1. ¹Los espectros de H-NMR para los copolímeros de bloques basados en poli(etilenglicol) (LEOL). (a) LL, (b) ML, (c) HL, (d) LH, (e) MH y (f) HH. La flecha indica la banda para el bloque EO ($\delta_{EO} = 3,55-3,8$ ppm), mientras que las estrellas indican los cambios químicos del bloque de L-lactida ($\delta_{L1} = 5,10-5,30$ ppm, $\delta_{L2} = 1,40-1,70$ ppm).

55

Tabla 5. Composición de copolímeros de bloques basados en poli(etilenglicol) (LEOL). ID del Copolímero

	Composición teórica	Composición por ¹ H-NMR	Relación mol. L/EO real
LL	L _{2.5} EO ₂₃ L _{2.5}	L _{2.3} EO ₂₃ L _{2.3}	0,20
ML	L ₅ EO ₄₆ L _{5.3}	L _{4.3} EO ₄₆ L _{4.3}	0,19
HL	L ₁₀ EO ₉₁ L ₁₀	L _{8.1} EO ₉₁ L _{8.1}	0,18
HM	L ₁₅ EO ₉₁ L ₁₅	n/a	n/a
LH	L ₅ EO ₂₃ L ₅	L _{4.5} EO ₂₃ L _{4.5}	0,39

MH	L ₁₀ EO ₄₆ L ₁₀	L _{9.1} EO ₄₆ L _{9.1}	0,39
HH	L ₂₀ EO ₉₁ L ₂₀	L _{16.3} EO ₉₁ L _{16.3}	0,36

5

En donde la relación molar L/EO real es la relación real determinada por ¹H NMR descrita anteriormente en la presente descripción para los monómeros de ácido láctico sobre los monómeros de óxido de etileno.

1.3. Preparación de mezclas de copolímeros de bloques basados en poli(etilenglicol) (LEOL)

10

Cada copolímero de bloque se mezcló con otro en las proporciones convenientes mediante una jeringa. La Tabla 6 muestra las mezclas preparadas, que incluye la relación mol. L/EO calculado en base a los datos que se obtienen de ¹H-NMR (Tabla 5). Tenga en cuenta que en una mezcla no puede hablarse estrictamente de una relación molecular L/EO, pero puede usarse como un indicador de la cantidad de ácido L-láctico en la mezcla final.

15

Tabla 6. Mezclas preparadas de copolímeros de bloques basados en poli(etilenglicol) (LEOL).

Composición [%v/v]	Observaciones	Relación mol, L/EO teórica
25LL75ML	Maleable	0,19
50LL50ML		0,19
25LL75HL		0,18
50LL50HL		0,18
25ML75HL		0,18
50ML50HL		0,18
50ML50HM	Maleable	n/a (teórico: 0,25)
25LH75MH	Duro	0,39
50LH50MH		0,39
25LH75HH		0,36
50LH50HH		0,36
25MH75HH		0,36
50MH50HH		0,37

20

Los bloques de EO más largos parecen resultar más duros con respecto a otros con un bloque de EO más corto, el aglutinante resultante parece ser mezclas más duras. Además, las mezclas que contienen copolímeros de bloque con una mayor relación molecular de L-ácido láctico/bloque EO son muy duras. El punto de fusión de las mezclas resultantes no es muy diferente al del componente con un bloque EO más largo.

25

Ejemplo 2. Esterilización de copolímeros de bloque y mezclas de estos.

Los copolímeros de bloque y las mezclas del Ejemplo 1 que se enumeran más abajo se esterilizaron con dos métodos diferentes: irradiación y haz electrónico.

30

- Copolímeros: LL, ML, HL
- Mezclas: 25LL75HL, 25ML75HL, 50ML50HL

Los materiales se compararon con sus contrapartes no estériles sobre la base de su aspecto bruto (Tabla 7).

35

Tabla 7. Observaciones generales de copolímeros de bloque y mezclas después de la esterilización.

ID	Observaciones en comparación con la contraparte no estéril
LL	irradiación γ: crema suave pero espesa (sin cambios observables).
	Haz de electrones: crema suave pero espesa (sin cambios observables).
ML	irradiación γ: masa dura (sin cambios observables).
	Haz de electrones: masa dura (sin cambios observables).

HL	irradiación γ : masa cerosa (sin cambios observables).
	Haz de electrones: masa cerosa (sin cambios observables).
25LL75HL	irradiación γ : masa dura y uniforme (sin cambios observables).
	Haz de electrones: masa dura y uniforme (sin cambios observables).
25ML75HL	irradiación γ : masa dura y uniforme (sin cambios observables).
	Haz de electrones: masa dura y uniforme (sin cambios observables).
50ML50HL	irradiación γ : masa dura y uniforme (sin cambios observables).
	Haz de electrones: masa dura y uniforme (sin cambios observables).

Ejemplo 3: *Prueba de banco in vitro* de la formulación de aglutinantes de copolímero LEOL con partículas dentro de la masilla.

3.1. Preparación de masillas

En base a una evaluación de manipulación positiva, se seleccionó un subconjunto de las mezclas de copolímeros de bloque del Ejemplo 1 como posibles aglutinantes de masilla. Se prepararon varias masillas con gránulos de cerámica CaP (tamaño 0,5-1 mm) y un aglutinante en una relación de volumen de aglutinante/CaP de 0,8. En consecuencia, el componente polimérico se fundió y se mezcló con gránulos de CaP. Posteriormente solo se consideraron las masillas (no estériles) que podrían retener gránulos.

3.2. Caracterización de masillas no estériles.

3.2.1. Prueba a ciegas

La prueba a ciegas se realizó por terceras personas para evaluar el rendimiento de manipulación de las masillas, que se calificaron de acuerdo con las pautas como se describió anteriormente en la presente descripción y en la Tabla 1. Se calculó la puntuación final (FS) de cada material, donde el peor desempeño se calificó con 5 y el mejor con 30. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

3.2.2. Prueba de disolución

La prueba de disolución se realizó mediante la inmersión de aproximadamente 1 mL de cada masilla en 11 mL de solución tamponada con fosfato (*es decir* PBS) a 37 °C sin agitación. En los puntos de tiempo de 1, 2, 4, 8, 16 y >16 minutos se tomaron fotografías. Las Figuras 1 y 2 muestran imágenes de la disolución durante el tiempo, al mismo tiempo que la Tabla 8 muestra los resultados.

La Figura 1 muestra los resultados de la disolución de la prueba para muestras no estériles en PBS.

Todos los aglutinantes LEOL no estériles tuvieron un inicio rápido de disolución (*a saber* dentro de 30-60 minutos) y permitieron que las masillas correspondientes liberaran los gránulos. Sin embargo, tenían diferentes velocidades de disolución ya que los cuerpos voluminosos en las masillas que contenían 25ML75HL, 50ML50HL, 25LL75HL, 50LL50HL, 50LH50HH y 25LH75MH estaban presentes después de 32 minutos (ver figura 2).

La Figura 2 muestra más resultados de la prueba de disolución para muestras no estériles en PBS. Etiquetas de leyenda de los materiales: (A) 25ML75HL; (B) 50ML50HL; (C) 50LL50ML; (E) 25LL75ML; (F) 25LL75HL; (G) 50LL50HL; (H) 50LH50HH; (I) 25LH75MH; (J) 50LH50MH.

Tabla 8. Masillas seleccionadas y resultados de las pruebas a ciegas y disolución.

Relación de vol, de la Composición aglutinante/CaP= 0,8	Prueba a ciegas	Prueba de disolución [min]
Gránulos de CaP 100LL	n/a	comienza a los 8 minutos, casi completamente disuelto a >16 minutos
Gránulos de CaP 100HL	n/a	comienza a los 16 minutos, casi completamente disuelto a >32 minutos
Gránulos de CaP 25LL75ML	21,4	comienza a los 16 minutos, parcialmente disuelto a >32 minutos

5	Gránulos de CaP 50LL50ML	20	comienza al 1 minuto, parcialmente disuelto a >16 minutos
	Gránulos de CaP 25LL75HL	24	comienza a los 16 minutos, casi completamente disuelto a >16 minutos
10	Gránulos de CaP 50LL50HL	22	comienza a los 16 minutos, casi completamente disuelto a >16 minutos
	Gránulos de CaP 25ML75HL	23,6	parcialmente disuelto a >16 minutos
15	Gránulos de CaP 50ML50HL	20,8	parcialmente disuelto a >16 minutos
	Gránulos de CaP 25LH75MH	n/a (pérdida de los gránulos)	comienza a los 2 minutos, casi completamente disuelto a >16 minutos
20	Gránulos de CaP 50LH50MH	n/a (pérdida de los gránulos)	comienza a los 2 minutos, casi completamente disuelto a >16 minutos
	Gránulos de CaP 50LH50HH	22,2	el menos disuelto a >16 minutos

Ejemplo 4: Síntesis de copolímero con bloque central diferente al PEG

Se prepararon dos familias de copolímeros que contienen L-lactida, que difieren en el tipo de su bloque central: uno con poli(propilenglicol) (es decir LPGL) y el otro con Pluronic® (LPUL). El bloque central podría ser con diferente peso molecular o diferentes tipos de Pluronic®. Cuando se consideró el mismo bloque central, además se consideraron diferentes relaciones molares de ácido láctico/bloque central.

4.1. Síntesis

Todos los copolímeros de bloque se sintetizaron mediante polimerización por apertura de anillo del monómero de L-lactida en presencia de poli(óxido de propileno) o Pluronic® P65 como iniciadores y octoato estañoso (es decir, SnOct₂) como catalizador. Todas las reacciones se realizaron bajo una atmósfera saturada de argón a 130 °C y una velocidad de agitación de 50 rpm durante 24 horas. La Tabla 9 muestra los copolímeros de bloque sintetizados.

Tabla 9. Copolímeros de bloque LPGL y PLUL.

Familia	ID del Copolímero	Propiedad de Diseño	de Relación mol. Teórica L/PG
LPGL basado en poli(propilenglicol)	PG4 _L	L _{7.5} PG ₆₈ L _{7.5}	0,22
	PG4 _M	L ₁₅ PG ₆₈ L ₁₅	0,44
	PG4 _H	L _{22.5} PG ₆₈ L _{22.5}	0,66
LPUL basado en Pluronic®	ID del Copolímero	Propiedad de Diseño	de Relación mol, L/EO teórica
	P65 _L	L ₁₁ P65L ₁₁	0,57
	P65 _M	L _{16.5} P65L _{16.5}	0,86
	P65 _H	L ₂₂ P65L ₂₂	1,15
	F127 _{LL}	L ₁₁ F127L ₁₁	0,11
F127 _M	L ₈₇ F127L ₈₇	0,87	

En donde la relación molar teórica de L/PG es la relación teórica como se describió anteriormente en la presente descripción para los monómeros de ácido láctico sobre los monómeros de óxido de etileno y óxido de propileno.

4.2. Caracterización de copolímeros.

4.2.1. Aspecto físico (bruto) de los copolímeros LPGL y LPUL

Los copolímeros se observaron con microscopio estereoscópico para detectar cualquier presencia de cualquier falla en la homogeneidad no conveniente. Posteriormente se caracterizaron por su dureza mediante la presión primero con herramientas de acero y después con las manos. La Tabla 10 resume las observaciones sobre los copolímeros LPGL y la Tabla 11 se refiere a los copolímeros LPUL.

Tabla 10. Observaciones físicas (manipulación) en copolímeros de bloques basados en poli(propilenglicol) (LPGL).

ID	Notas
PG4 _L	A temperatura ambiente, fluido viscoso que tiende al color blanco.
PG4 _M	Semisólido viscoso y blanco que se solidifica rápidamente tan pronto como la temperatura baja de 130 °C.
PG4 _H	Fluido blanco y espeso que se solidifica rápidamente tan pronto como la temperatura baja de 130 °C.

En base a las observaciones generales, puede decirse que el material se endurece con el aumento del tamaño del bloque de L-lactida (por ejemplo, PG4_L vs. PG4_M vs. PG4_H).

Tabla 11. Observaciones físicas (manipulación) en copolímeros de bloques basados en Pluronic® (LPUL).

ID	Notas
P65 _L	A temperatura ambiente es líquido.
P65 _M	A temperatura ambiente es líquido.
P65 _H	Masa suave
F127 _{LL}	Masa sólida dura de color parduzco.
F127 _M	Masa sólida dura de color parduzco.

4.2.2. Prueba de disolución de copolímeros LPGL

Las masas cuidadosamente pesadas de copolímeros de bloque (m₀) de PG4_M y PG4_H se colocaron en 100 mL de agua destilada, durante una semana a 37 ± 1 °C y se agitaron suavemente. Se consideraron tres puntos de tiempo (es decir 1, 4 y 7 días; 1 réplica por punto de tiempo), cuando se recolectaron las muestras, se eliminó el exceso de agua y se midió su peso húmedo (m_w). Después, cada muestra se fotografió y después se secó al vacío a 37 ± 1 °C hasta la estabilización de sus pesos. Por lo tanto, se tomaron los pesos en seco (m_d). Podrían calcularse los cambios en la absorción de fluido (FU) y la pérdida de masa (ML) (en %), para cada muestra en cada punto de tiempo, como

$$FU = 100 * (m_w - m_d) / m_d$$

$$ML = 100 * (m_0 - m_d) / m_0$$

El cambio dimensional está determinado por la variación del diámetro promedio (en %) durante el tiempo, donde el diámetro promedio viene dado por el promedio de los diámetros medidos en diferentes direcciones. La Tabla 12 muestra los resultados para la absorción de fluidos, la pérdida de masa y los cambios de dimensión promedio (Figura 3).

Tabla 12. Degradación de una semana de copolímeros de bloques basados en poli(propilenglicol) (LPGL).

Copolímero	Pérdida de Masa [%]			Absorción de Fluidos [%]			Cambio de Dimensión [%]		
	1 día	4 días	7 días	1 día	4 días	7 días	1 día	4 días	7 días
PG4 _M	1,6	1,5	2,6	4,9	3,5	3,0	17,1	7,5	2,6
PG4 _H	7,6	8,5	8,4	6,6	9,0	9,7	10,3	17,2	11,1

Los copolímeros LPGL parecen cambiar con el tiempo cuando entran en contacto con PBS, pero retienen su masa voluminosa.

4.3. Preparación de masillas basadas en LPGL y LPUL y propiedades de disolución

Las masillas se prepararon con gránulos de cerámica CaP (tamaño 0,5-1 mm) y un aglutinante en una relación de volumen de aglutinante/CaP de 0,8. Cada masilla se sometió a una prueba de disolución (ver el Ejemplo 3.2.2 para el procedimiento): La Tabla 13 y la figura 4 muestran los resultados con respecto a las masillas basadas en LPGL.

Tabla 13. Observaciones físicas (manipulación) en masillas de copolímero a base de poli(propilenglicol) (LPGL).

ID	Propiedad de manipulación	Disolución
masilla PG4L	Pierde gránulos, no maleables.	Se liberaron gránulos, pero el polímero no se disolvió.
masilla PG4M	Muy buena manipulación.	La masilla retiene la forma y el tamaño durante una semana.
masilla PG4H	Buenas características de manipulación.	La masilla retiene la forma y el tamaño durante una semana.

La Figura 4 muestra que la masilla basada en PG4_L libera rápidamente gránulos y forma una pequeña bola de polímero. Tan pronto como se eliminó el medio de degradación, la bola de polímero perdió forma. En contraste, las masillas a base de PG4_M y PG4_H conservaron la forma durante todo el experimento (es decir una semana).

Todas las masillas basadas en LPUL eran solubles en agua y podían liberar los gránulos de cerámica (Tabla 14). Puede verse que aquellos aglutinantes que tienen menos polilactida tenían una velocidad de disolución más alta.

Tabla 14. Propiedades de manipulación y disolución de las masillas de copolímero de bloques basadas en Pluronic® (LPUL).

ID	Propiedad de manipulación	Disolución
masilla P65 _L	Pierde gránulos, no maleables.	Se disolvió en 5 minutos, con liberación de gránulos.
masilla P65 _M	Buena manipulación.	Se disolvió en 1,5-2 horas, con liberación de gránulos.
masilla P65 _H	Masilla frágil.	Se disolvió parcialmente durante 4 días.

Ejemplo 5: Masillas de esterilización

5.1 Esterilización de masillas LEOL

Determinadas masillas LEOL del Ejemplo 3.1 se esterilizaron con irradiación y (25-40 kGy) y se evaluó su capacidad para retener gránulos y conformarse. Después se seleccionó un subgrupo en base a los resultados de manipulación y se sometió a una prueba de disolución. La Figura 5 ilustra el comportamiento de disolución de las masillas seleccionadas, que parece similar a las no estériles (Figura 1).

A partir de las cifras en el tiempo T=0 min, puede verse cuales masillas aún podían retener gránulos y conformarse después de la esterilización (es decir, masillas con LL, 75LL25HL, 50LL50HL, 25LL75HL y HL).

Otras masillas determinadas del Ejemplo 3.1 se esterilizaron con irradiación y y se compararon con sus contrapartes no estériles en base a las propiedades brutas de conformación (Tabla 15), al mismo tiempo también se evaluó su velocidad de disolución en PBS a 37 °C (Figura 6).

Determinadas masillas (por ejemplo, masilla ML) mostraron características de manipulación incluso ligeramente mejoradas después de la esterilización.

La Figura 6A muestra la forma y el tamaño iniciales de las masillas estériles. Todas retuvieron los gránulos después de la esterilización y mantuvieron la forma. Sin embargo, como se informó en la Tabla 15, tenían diferentes propiedades de manipulación. La Figura 6B muestra las masillas después de 32 minutos en PBS. Las masillas con aglutinantes basados en PEG comenzaron a desintegrarse, lo que indica una rápida activación de la disolución del aglutinante. La Figura 6C muestra los materiales compuestos después de una hora: todas las masillas basadas en PEG liberaron la mayoría de los gránulos (observe que el bloque central sigue íntegro: este desaparecerá durante la próxima hora). Las masillas basadas en Pluronic y poli(propilenglicol) no se desintegraron en absoluto y no liberaron ningún gránulo después de una hora. Seguirán manteniendo la misma forma después de dos días.

Tabla 15. Manipulación de determinadas masillas después de la irradiación y.

ID de la formulación de masillas y aglutinante (relación v/v de CaP/aglutinante = 1,2-1,3)	Observaciones en comparación con la contraparte no estéril
masilla A (25ML75HL)	No estéril: masa consistente, se ve dura pero es moldeable
	Después de la irradiación y: más suave, con buena conformabilidad, y no adhesiva
masilla ML (100ML)	No estéril: moldeable, más suave que la masilla A Después de la irradiación y: buena conformabilidad (incluso si es un poco dura al principio) y no adhesiva
masilla HM (100HM)	No estéril: dura, y es necesario trabajarla con las manos antes de moldearla Después de la irradiación y: demasiado duro
masilla NUEVA (50ML50HM)	No estéril: masa consistente, se ve dura pero es moldeable
	Después de la irradiación y: más dura pero aún moldeable

5.2 Esterilización de masillas basadas en LPGL

Dos masillas preferidas basadas en LPGL del Ejemplo 4 se esterilizaron con irradiación y (25-40 kGy). La Tabla 16 muestra las observaciones.

Tabla 16. Manipulación de masillas de copolímero basadas en poli(propilenglicol) (LPGL) después de la esterilización.

ID	Propiedad de manipulación después de la esterilización
masilla PG _{4M}	No estéril: excelentes propiedades de conformación Después de la irradiación y: buena conformabilidad, pero un poco adhesiva. Se retuvieron los gránulos y se mantuvo la forma, se observaron las mismas propiedades de manipulación.
masilla PG _{4H}	Se retuvieron los gránulos y se mantuvo la forma, se observaron las mismas propiedades de manipulación.
masilla P65 _M	No estéril: masa suave y adhesiva Después de la irradiación y: demasiado suave, con pérdida de gránulos

Ejemplo 6 Rendimiento biológico *in vivo* de masillas LEOL seleccionadas en el modelo de osteoinducción

Se implantaron cuatro masillas LEOL del Ejemplo 3.1 (Tabla 17) en el músculo de la espalda de cinco perros durante 8 semanas para evaluar el efecto de cuatro aglutinantes LEOL diferentes sobre el potencial de osteoinducción de los gránulos cerámicos de fosfato de calcio (tamaño 0,5-1 mm). Después de la recolección y del procesamiento histológico, se tiñeron con azul de metileno/fucsina básica y se seccionaron.

Tabla 17. Las masillas basadas en LEOL implantadas.

Descripción del material	Notas
Masilla A	aglutinante 25ML75HL con gránulos de CaP (0,5-1 mm) en una relación de volumen de polímero/CaP de 0,8
Masilla B	Aglutinante 50ML50HL con gránulos de CaP (0,5-1 mm) en una relación de volumen polímero/CaP de 0,8
Masilla F	Aglutinante 25LL75HL con gránulos de CaP (0,5-1 mm) en una relación de volumen de polímero/CaP de 0,8
Masilla MH	Aglutinante de 100MH con gránulos de CaP (0,5-1 mm) en una relación de volumen de polímero/CaP de 0,8

No se observó mucha diferencia entre los cuatro materiales compuestos, y las observaciones histológicas son comparables entre sí.

5 Para todos los materiales compuestos se observó formación ósea, principalmente dispersa en puntos en toda el área del implante. El osteoide, con un cordón de células osteoblastos que recubren su superficie del borde, estaba presente lo que indica una formación ósea activa. Los restos de cerámica CaP se observaron ocasionalmente dispersos en la matriz de tejidos blandos en forma de pequeñas partículas (dimensiones del orden de decenas de micras). Muchas células gigantes multinucleadas, con nanopartículas cerámicas de CaP fagocitadas, estaban presentes en la superficie de los gránulos cerámicos. Cuando no se observó hueso (*es decir* una B, una F y una MH), se observó una cantidad muy limitada de células y el tejido blando parecía fibroso. No se observaron signos inflamatorios en ningún explante y no se formó una cápsula fibrótica.

15 En la comparación visual de las muestras de masilla, no se observó mucha diferencia lo que indica que los cuatro geles se desempeñaron de manera similar. Cuando se compararon las masillas con las cerámicas CaP solas, parecía que se producía un poco menos de formación ósea, lo que indica un posible efecto leve de obstaculización ósea de los geles. Sin embargo, los osteoides y las células osteoblásticas indican que, después de 8 semanas de implantación, la formación ósea sigue en curso y puede conducir a un mayor volumen óseo en etapas posteriores. La presencia de células gigantes multinucleadas y de residuos cerámicos dispersos en la matriz de tejidos blandos, y la ausencia simultánea de signos de inflamación, indican que es activa la reabsorción de los gránulos cerámicos conducida por las células.

20 La Figura 7 muestra imágenes detalladas del microscopio para cada material compuesto y el análisis histológico del perro 2. En (a) es una vista general de la masilla A, (b) es una vista general de la masilla B, (c) es una vista general de la masilla F, y (d) es una vista general de la masilla MH. La barra de escala en (a) se aplica a todas las vistas generales. Las imágenes detalladas tomadas con un aumento mayor (x10) se muestran en (e) para la masilla A, (f) para la masilla B, (g) para la masilla F y (h) para la masilla MH. Los círculos en (e), (f), (g) y (h) indican residuos de cerámica dispersos en la matriz de tejidos blandos. Los cuadros en (e), (f), (g) y (h) indican dónde se tomaron las imágenes con mayor aumento (x20): (i) es la masilla A, (m) es la masilla B, (n) es la masilla F y (o) es la masilla MH. La letra M significa material (*es decir* gránulos de cerámica CaP), las estrellas negras indican osteoide, las flechas negras muestran los cordones de las células osteoblastos y las flechas grises muestran células gigantes multinucleadas que fagocitan en la superficie de los gránulos.

Ejemplo 7. Selección de una formulación aglutinante adecuada

35 En este ejemplo, se prepararon y analizaron mezclas adicionales de copolímeros de bloque L-lactida/EO. La síntesis de los copolímeros y las mezclas se realizó de manera análoga al Ejemplo 1.1. Se prepararon las siguientes mezclas de copolímeros.

Tabla 18. Mezclas de copolímeros

ID	Formulación	Relación L/EO real	mol.
40 <i>Mezcla A</i>	26,4 % en peso. L-lactida + 18,4 % en peso. PEG2000 + 55,2 % en peso. PEG4000	0,18	
45 <i>Mezcla C</i>	15 % en peso. L-lactida + 21,25 % en peso. PEG1000 + 63,75 % en peso. PEG2000	0,10	
<i>Mezcla W</i>	15 % en peso. L-lactida + 23,4 % en peso. PEG1000 + 59,5 % en peso. PEG2000 + 2,1 % en peso. PEG3000	0,11	
50 <i>Mezcla Z</i>	25 % en peso. L-lactida + 37,5 % en peso PLU85 + 37,5 % en peso PEG4000	<0,05	

55 En donde la relación molar L/EO real es la relación real determinada por ¹H NMR descrita anteriormente en la presente descripción para los monómeros de ácido láctico sobre los monómeros de óxido de etileno.

7.1. Caracterización de las mezclas

60 El punto de fusión se determinó como se describió en el Ejemplo 1 (1.2.2.), Y la viscosidad intrínseca se midió con un viscosímetro Ubbelohde (25 °C, 0,33 g/dL). Las observaciones físicas se realizaron como se describió en los ejemplos anteriores.

Los resultados de la caracterización de la mezcla se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19: Caracterización de las mezclas

ID	Intervalo de fusión [°C]	Viscosidad intrínseca (dL/g)	Observaciones
<i>Mezcla A</i>	41 - 43	0,16	masa cerosa dura o semidura
<i>Mezcla C</i>	49 - 52	0,10	masa cerosa suave
<i>Mezcla W</i>	49 - 51	0,13	masa cerosa suave
<i>Mezcla Z</i>	45 - 47	0,18	masa cremosa moldeable y adhesiva

7.2. Idoneidad de las mezclas para masilla

Las masillas se prepararon mediante la mezcla de los diferentes copolímeros con gránulos cerámicos de fosfato de calcio (1-2 mm) como se describió en el Ejemplo 3.1. Se realizó una prueba de manipulación a ciegas en aire seco en las masillas resultantes:

- *Mezcla A*: masilla dura, que necesita calentarse en las manos durante unos minutos para obtener suavidad y ser moldeable;
- *Mezcla C*: masilla maleable, sin necesidad de calentamiento;
- *Mezcla W*: masilla maleable, muy similar a la preparada con la *Mezcla C*;
- *Mezcla Z*: material débil, que se descompone fácilmente tan pronto como se forma.

La maleabilidad de las cuatro masillas se evaluó, además, en condiciones húmedas, es decir, se moldearon en agua: *La Mezcla A* y *la Mezcla Z* se desestabilizaron rápidamente perdiendo su maleabilidad y no pudieron retener los gránulos de cerámica. Por el contrario, *la Mezcla C* y *la Mezcla W* retuvieron los gránulos de cerámica al mismo tiempo que se moldeaban, y podrían moldearse durante más tiempo.

Las masillas se evaluaron, además, en una prueba de disolución durante un período de tiempo. Las masillas se cortaron en discos y se colocaron en un extremo de un portaobjetos de vidrio. Estos portaobjetos se colocaron en tubos rellenos con 50 mL de PBS, que se mantuvieron inclinados a 45° a 37 °C. La Figura 8 muestra los principales criterios de valoración de la prueba de disolución de las masillas. Todas las masillas se disolvieron de manera aceptable. *La Mezcla C* y *la Mezcla W* tuvieron una disolución más rápida que condujo a una desestabilización de la masilla más rápido en comparación con *la Mezcla A* (PEG con mayor peso molecular) y *la Mezcla Z* (presencia de Pluronic P85, que presenta poli(propilenglicol) hidrófobo en su estructura).

Ejemplo 8: efecto de la relación L/EO (es decir, papel del contenido de lactida en la formulación)

Se evaluó el efecto de la relación L/EO sobre las propiedades físicas del copolímero. Tres formulaciones, basadas en *la Mezcla C*, se prepararon con diferente contenido de lactida como se resume en la Tabla 20. La temperatura de fusión de los tres materiales se determinó con calorimetría diferencial de barrido (DSC) en el intervalo de 25-65 °C con una velocidad de aumento de temperatura de 10 °C/minuto. Los resultados se muestran en la Tabla 20 y en la Figura 9, la última muestra curvas DSC para las tres formulaciones: la disminución de la temperatura de fusión con el aumento del contenido de lactida es claramente visible. La figura 10 muestra el aspecto físico de las formulaciones de acuerdo con el contenido de lactida.

Tabla 20: Caracterización de las mezclas preparadas con diferentes contenidos de lactida

ID	Formulación	Relación molar L/EO real	Temperatura de fusión [°C]	Observaciones (ver además la Figura 10)
<i>Alto</i>	70 % en peso. L-lactida + 7,5 % en peso. PEG1000 + 22,5 % en peso. PEG2000	0,93	n/a	masa líquida a semilíquida. Cuando se forma, se extiende sobre la superficie
<i>Medio</i>	15 % en peso. L-lactida + 21,25 % en peso. PEG1000 + 63,75 % en peso. PEG2000	0,10	47,1	masa cerosa suave que, cuando se forma, mantiene la consistencia y puede recuperarse

Cero	25 % en peso de PEG1000 + 75 % en peso de PEG2000	0	55,4	masa frágil, no es posible dar forma
------	---	---	------	--------------------------------------

5

10

La variación del contenido de lactida resultó en mezclas con diferentes características físicas. Este ejemplo demuestra la relación entre la relación L/EO real (*es decir* la relación de unidades de ácido láctico (bloque hidrófobo) sobre unidades de óxido de etileno (bloque hidrófilo), el punto de fusión (T_m), la longitud del PEG y la dureza de la masilla, como se representa en la Figura 11.

REIVINDICACIONES

1. Material compuesto biocompatible anhidro que comprende un material polimérico biodegradable y un material sintético granular, en donde el material polimérico consiste esencialmente en al menos un copolímero de bloque, en donde al menos un copolímero de bloque es un polímero de acuerdo con la fórmula (I)
- $$X_n-B_qA_p-B_q-X_m-[B_q-A_p-B_q]_l \quad (I)$$
- en donde;
- A y B son, independientemente, óxido de metileno, óxido de etileno, óxido de propileno, óxido de butileno, o dioxanona, preferentemente, óxido de etileno u óxido de propileno;
- X es una unidad de poliamida, poliuretano, policarbonato o poliéster, preferentemente una unidad de poliéster, con mayor preferencia hidroxibutirato, ácido láctico, glicólido, γ -butirolactona, δ -valerolactona o ϵ -caprolactona, con la máxima preferencia ácido láctico;
- l* es 0 o 1, preferentemente 0;
- m* es 1 a 25;
- n* es *m* o 0;
- p* es 2 a 150;
- q* es 0 a 100; y
- l* + *n* es más que 0.
2. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con la reivindicación 1, en donde *l* es 0 y *n* es *m*.
3. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con la reivindicación 1, en donde *l* es 1 y *n* es 0.
4. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde *m* es 2 a 10, preferentemente 3 a 7; *p* es 6 a 100, preferentemente 40 a 50; y/o *q* es 0 a 50, preferentemente 0 a 19.
5. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con la reivindicación 1, en donde el material sintético granular es osteoconductor y preferentemente osteoinductor.
6. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material sintético granular comprende fosfato de calcio.
7. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la relación real (*n* + *m*) a (*p* + *q*), como se determinó mediante ¹H NMR, es menor que 0,36, preferentemente menor que 0,30, con mayor preferencia entre 0,01 y 0,25, incluso con mayor preferencia entre 0,05 y 0,15, con la máxima preferencia aproximadamente 0,10.
8. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material polimérico consiste esencialmente en una mezcla de dos o más copolímeros de bloques, de los cuales al menos uno es el polímero de conformidad con la fórmula (I) como se definió de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7, preferentemente en donde dichos dos o más copolímeros de bloque están todos de conformidad con la fórmula como se definió de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7, con mayor preferencia en donde *m* es *n*; *l* y *q* son 0.
9. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es una masilla no adhesiva inyectable, maleable y/o amasable que retiene su forma a una temperatura típica de 15 a 40 °C.
10. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con la reivindicación 9, que se esteriliza mediante rayos γ o haces de electrones.
11. Material compuesto biocompatible anhidro de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar como un medicamento, preferentemente para ingeniería de tejidos, en particular para el tratamiento de tejido conectivo y/o pérdida o defecto óseo.
12. Método para la esterilización de un material polimérico biodegradable de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consiste esencialmente en uno o más copolímeros de bloques que comprenden al menos un bloque hidrófilo y al menos un bloque hidrófobo, en donde el material polimérico biodegradable se irradia por rayos γ o haz de electrones.

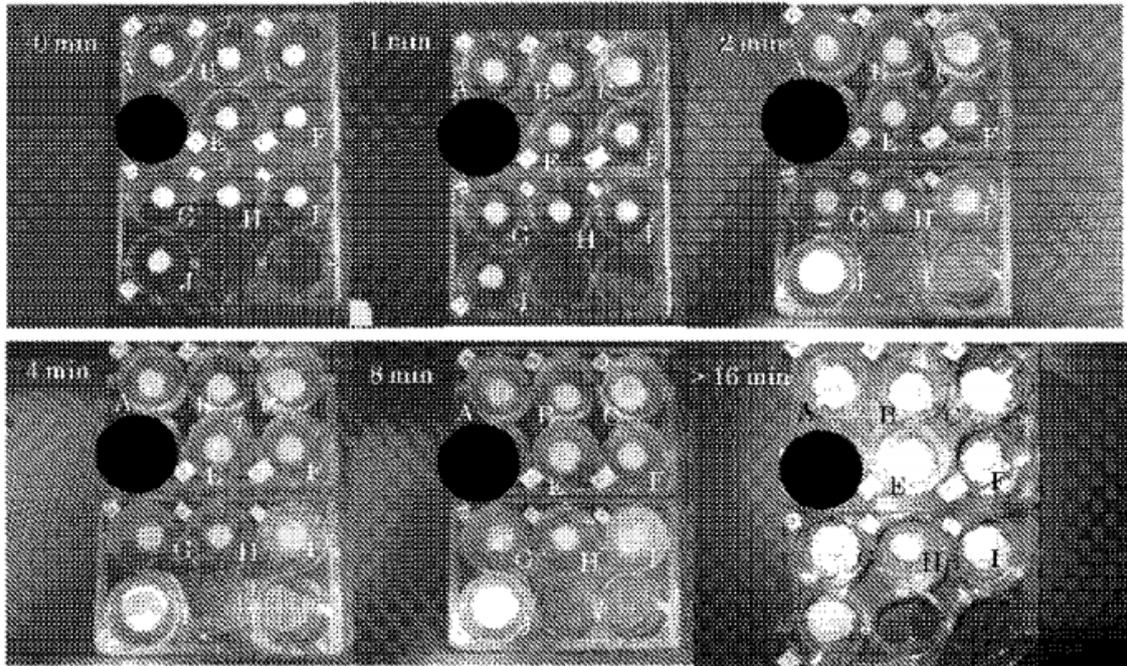


FIGURA 2

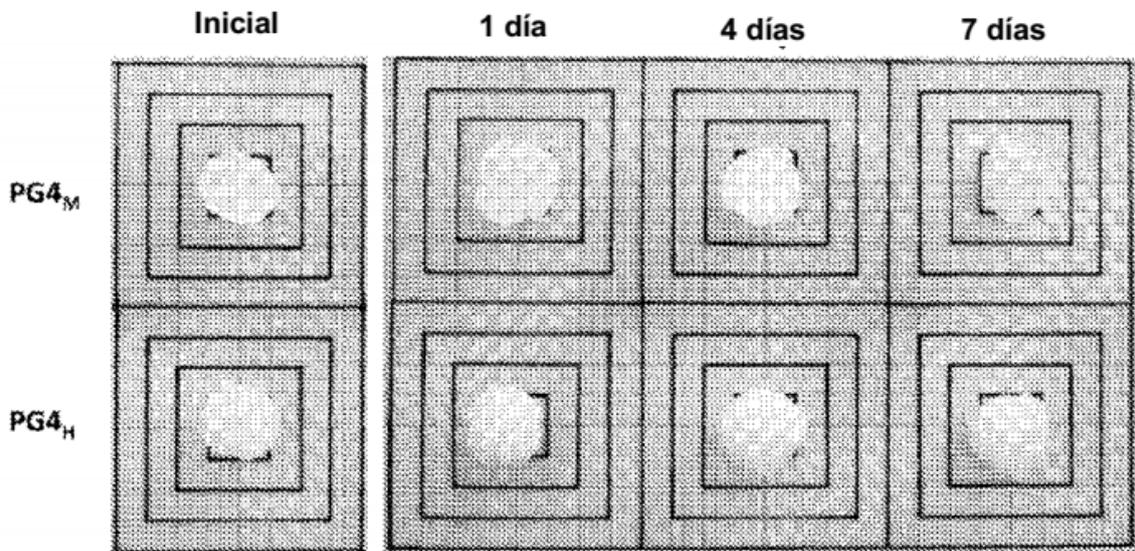


FIGURA 3

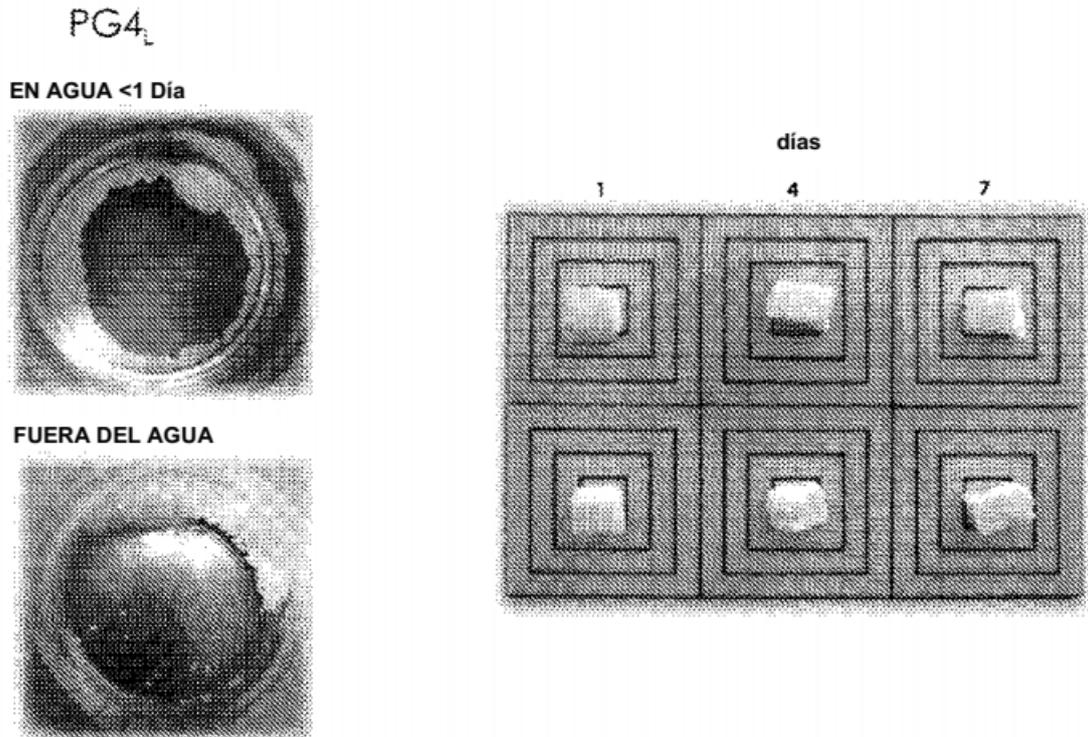


FIGURA 4

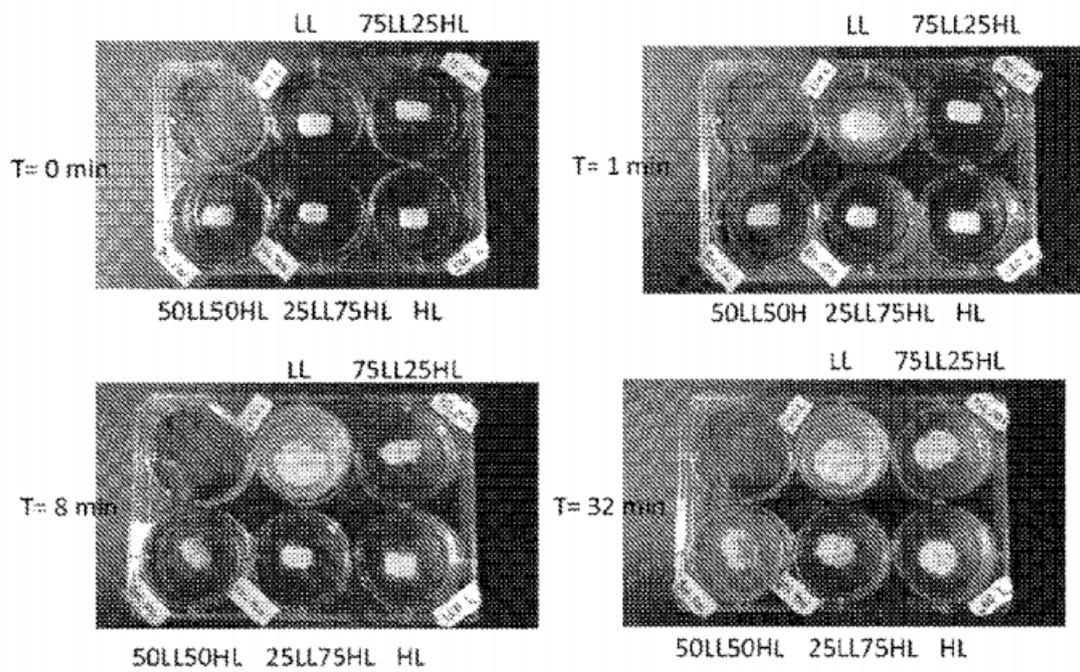


FIGURA 5

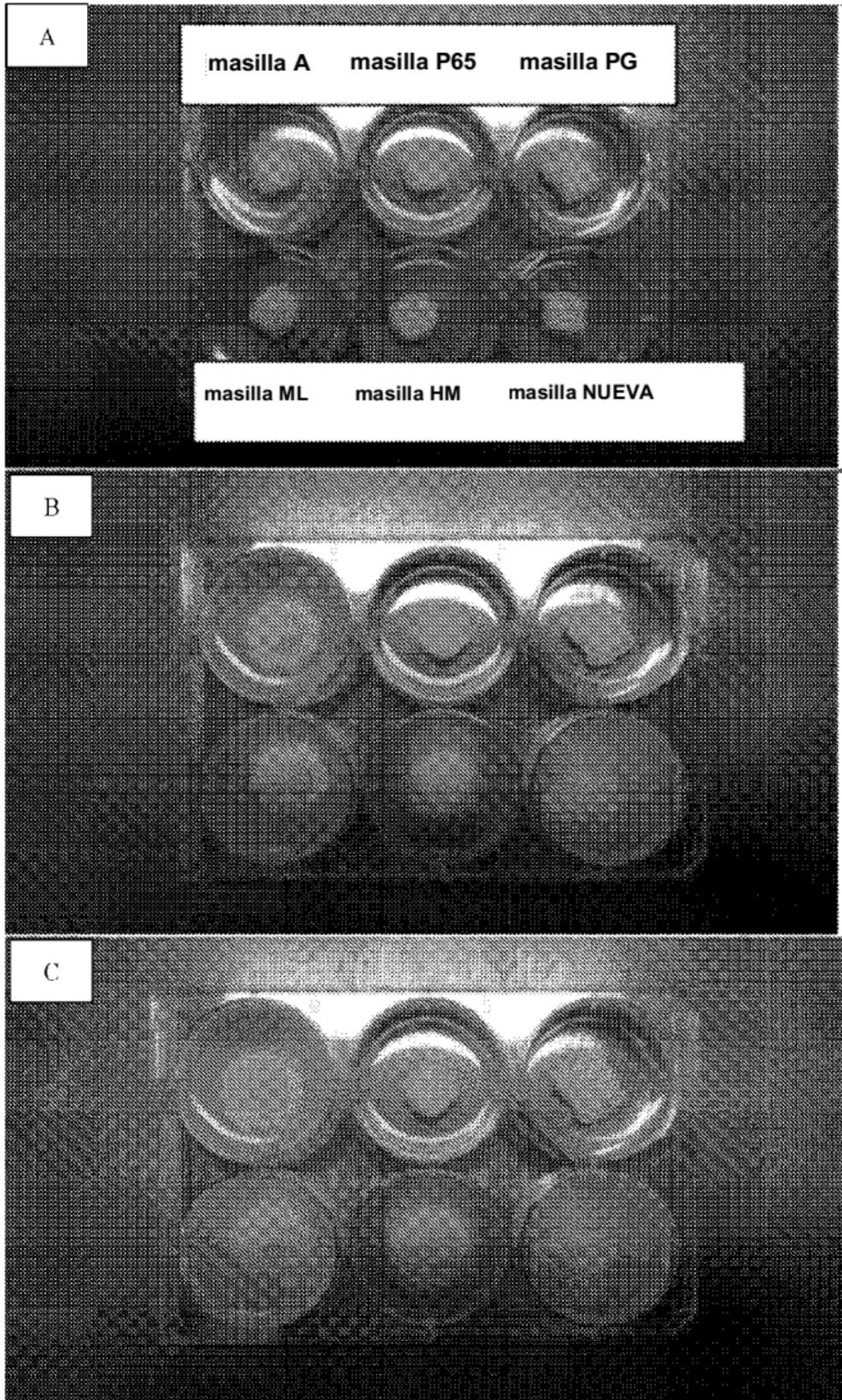


FIGURA 6

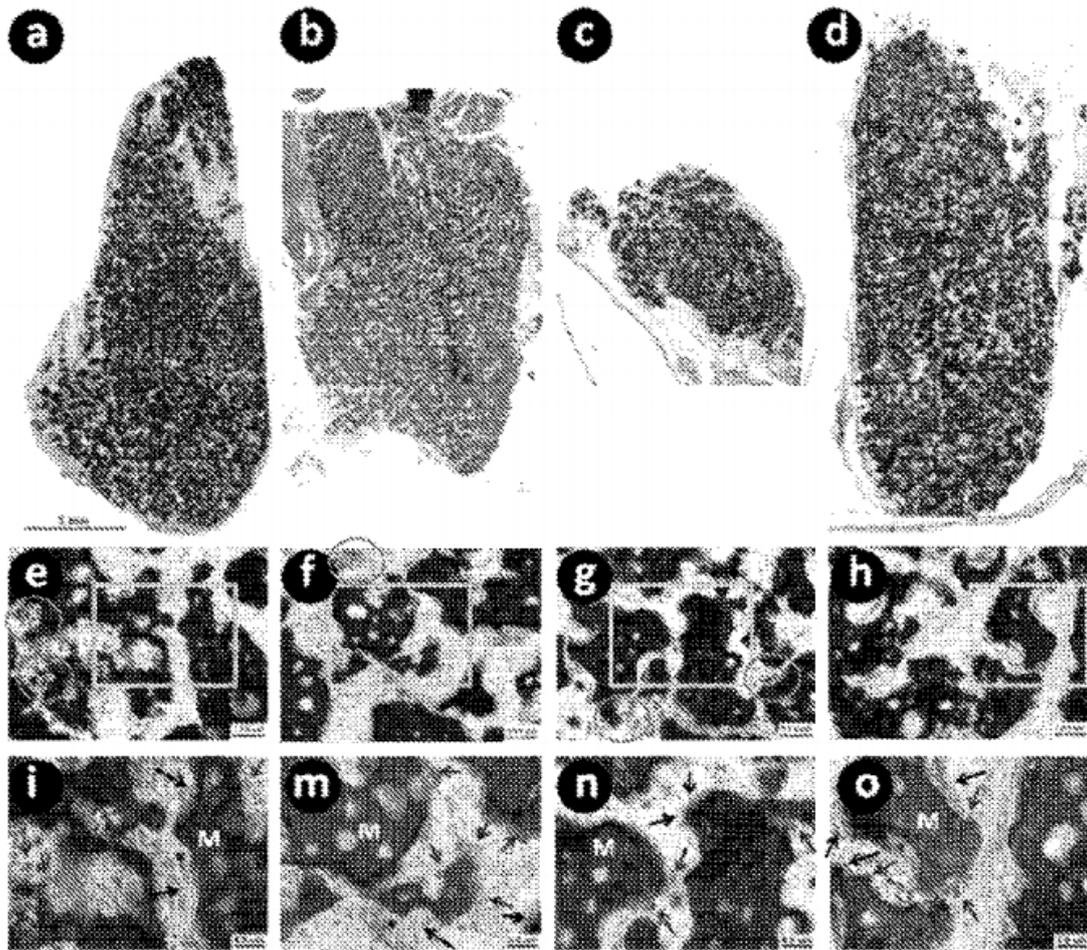


FIGURA 7

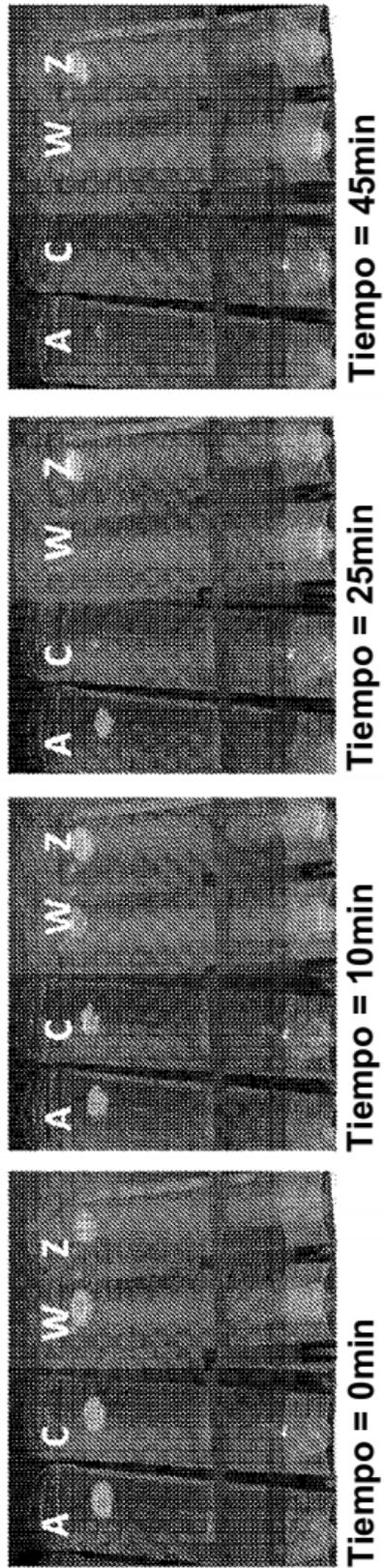


FIGURA 8

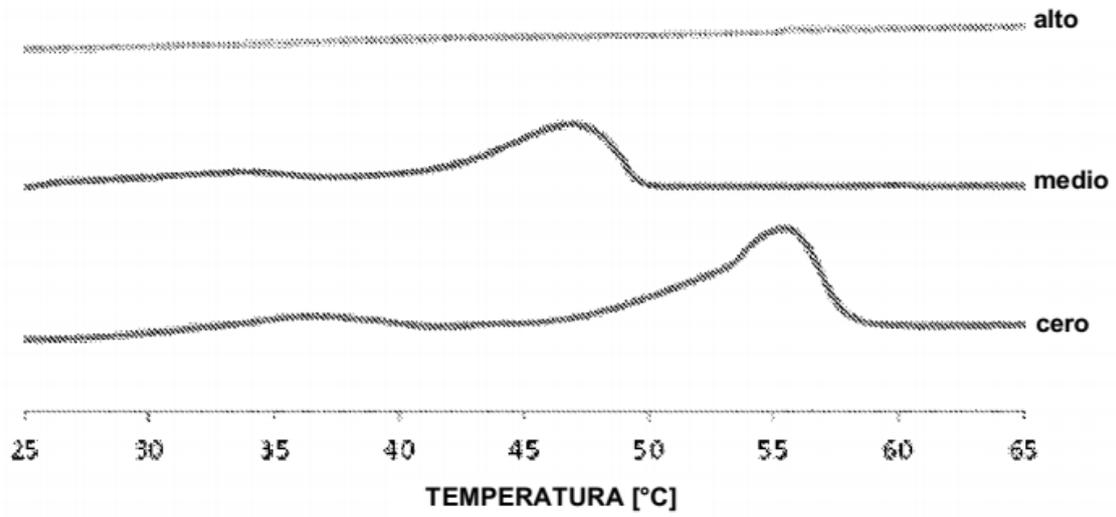


FIGURA 9

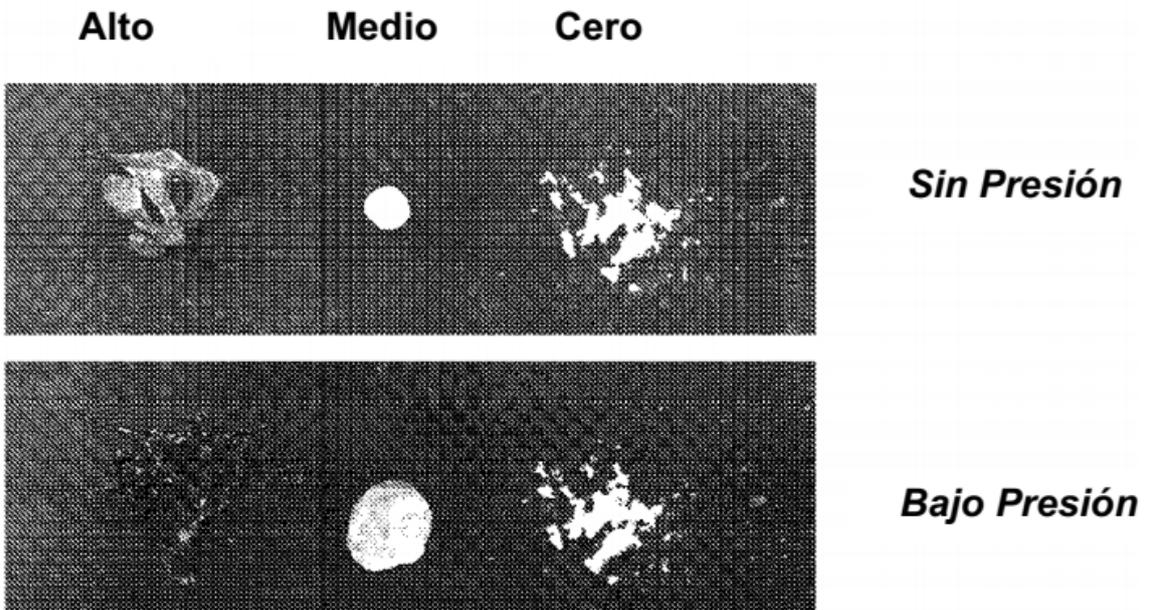


FIGURA 10

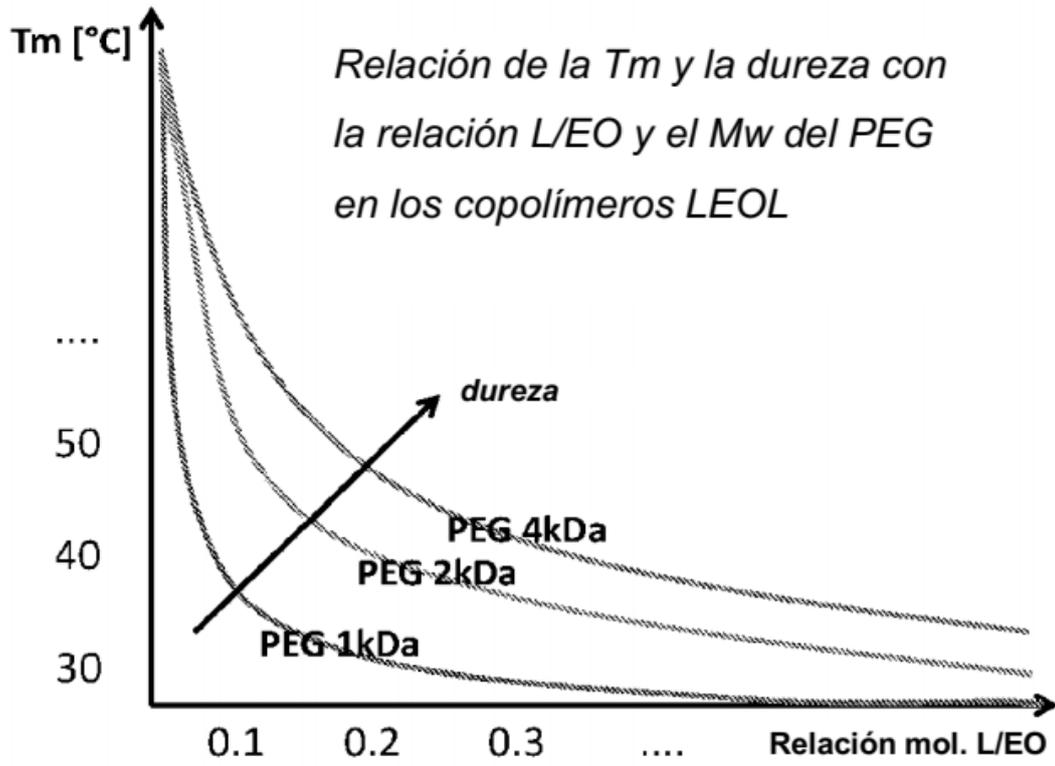


FIGURA 11