



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 343**

51 Int. Cl.:
A61L 27/12 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03717407 .5**
96 Fecha de presentación : **18.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1480687**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54 Título: **Compuesto fosfocálcico modificado, composición inyectable que lo contiene.**

30 Prioridad: **04.03.2002 FR 02 02707**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.06.2009

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR
Université de Nantes y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)**

72 Inventor/es: **Bujoli, Bruno;
Josse, Solen;
Guicheux, Jérôme;
Janvier, Pascal;
Bouler, Jean-Michel y
Daculsi, Guy**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 322 343 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

Compuesto fosfocálcico modificado, composición inyectable que lo contiene.

5 La invención se refiere a un compuesto fosfocálcico modificado con un compuesto gem-bifosfónico, a un procedimiento para su preparación, así como a su utilización para la elaboración de una composición inyectable.

10 El desarreglo de la actividad ósea de un individuo es el origen de numerosas patologías óseas, tales como la osteoporosis, la enfermedad de Paget o los tumores osteolíticos. Teniendo en cuenta particularmente el aumento de la longevidad de las personas, la osteoporosis se ha convertido en un problema de sanidad pública y se han emprendido numerosas investigaciones para remediarla. Ya que las patologías óseas consideradas están provocadas por un desequilibrio del remodelado óseo en beneficio de la actividad de los osteoclastos, una de las vías de tratamiento considerada consiste en disminuir la actividad de los osteoclastos, con vistas a ralentizar la degradación de la materia ósea.

15 Las investigaciones efectuadas sobre diversos ácidos gem-bifosfónicos han mostrado su poder inhibitorio de la actividad de los osteoclastos (G. A. Rodan, *et al.*, Therapeutic Approaches to Bone Diseases, 1 septiembre 2000, vol. 289, Science, p.1508-1514). El uso de algunos de ellos como medicamento ha sido admitido en algunos países, particularmente el etidronato, clodronato, pamidronato, alendronato, risedronato, tiludronato e ibandronato. Se han publicado 20 datos para otros compuestos ácidos gem-bifosfónicos, particularmente zoledronato, incadronato, olpadronato, neridronato. Los ácidos gem-bifosfónicos que se utilizan actualmente para el tratamiento de lesiones óseas se utilizan por vía sistémica y generan por este hecho algunos efectos secundarios indeseables. Pueden provocar trastornos renales cuando se administran por vía intravenosa, y trastornos del sistema digestivo, particularmente esofagitis o úlceras de estómago, cuando se administran por vía oral [(Lin J.H., Bone 1996: 18; 75-85) o (Thiébaud D. *et al.*, Osteoporos Int 1994; 76-73)]. Otro inconveniente de la administración por vía oral reside en el nivel bajo de absorción del principio 25 activo sobre la materia ósea.

30 Se conocen además composiciones inyectables destinadas a formar sustitutos óseos. La patente FR-2715853 describe composiciones para bio-materiales de resorción/sustitución de tejidos de sostén, que comprenden una fase mineral compuesta de BCP o de fosfato de calcio-titanio, y una fase acuosa líquida que comprende una disolución acuosa de un polímero derivado de la celulosa. Estas composiciones inyectables no contienen ningún principio activo.

35 El documento WO 00/47214 describe una composición utilizable por inyección para el tratamiento de la osteoporosis o de recidivas de tumores líticos por inhibición de la actividad osteoclástica obtenida al poner en contacto una pasta de cemento óseo con un agente anti-resortivo tal como un bifosfonato.

40 Se conocen igualmente sustitutos óseos no inyectables, que se presentan en forma de implantes. Por ejemplo, H. Denissen, *et al* (J. Periodontal, vol. 71, n°2, Febrero 2000, p. 280-296) describe implantes de hidroxiapatita modificada por adsorción de un ácido gem-bifosfónico particular, a saber, el ácido (3-dimetilamino-1-hidroxipropilideno)-1,1-bifosfónico u olpadronato. La liberación *in situ* del ácido favorecería la reconstrucción ósea. Sin embargo, la hidroxiapatita en sí misma presenta el inconveniente de ser débilmente resorbible.

45 El objeto de la presente invención es proporcionar una composición que contiene un principio activo que inhiba la actividad de los osteoclastos y que pueda administrarse sin producir los efectos secundarios asociados a una administración por vía sistémica o a la utilización de un implante sólido.

50 Debido a esto la presente invención tiene por objeto un compuesto fosfocálcico modificado, un procedimiento para su preparación, así como su utilización como principio activo en una composición inyectable.

55 El compuesto fosfocálcico modificado según la presente invención puede obtenerse añadiendo un ácido gem-bifosfónico o una de sus sales de metal alcalino o alcalino-térreo a una suspensión de un compuesto fosfocálcico precursor en agua ultra-pura, agitando el medio de reacción a temperatura ambiente, a continuación recuperando por centrifugación el compuesto formado. El compuesto puede purificarse a continuación por lavado con agua ultra-pura, seguido de una filtración y de un secado al aire a temperatura ambiente. El compuesto fosfocálcico precursor se 55 elige entre los ortofosfatos de calcio que tienen una solubilidad en agua superior a $4 \cdot 10^{-59}$ mol.l⁻¹. Como ejemplo, se pueden citar los BCP, que son una mezcla de hidroxiapatita y fosfato tricálcico β (generalmente designado por β -TCP) en proporciones variables, CDA, que es una hidroxiapatita deficiente en calcio (obtenida por ejemplo por hidrólisis alcalina de un ortofosfato de calcio ácido), y β -TCP.

60 Por agua ultra-pura, se entiende en este texto agua que tiene una resistividad próxima a 18 M Ω cm.

65 La agitación a temperatura ambiente se mantiene de preferencia durante una duración entre 1 h y 72 h, por ejemplo durante 48 horas. La naturaleza de la agitación y la granulometría del compuesto fosfocálcico precursor tienen un efecto sobre la proporción de compuesto gem-bifosfónico que puede injertarse. Por tanto es preferible, cuando se elige una granulometría dada para el compuesto fosfocálcico precursor, adaptar la agitación de forma que no se modifique dicha granulometría.

ES 2 322 343 T3

Los ácidos o las sales que pueden utilizarse como compuestos gem-bifosfónicos responden a la fórmula (OY) (OX) P(O)-CR¹R² P(O) (OX) (OY) en la que X o Y representan independientemente uno del otro H o un catión de metal alcalino o alcalino-térreo, R¹ representa H, OH o un halógeno, y R² representa:

- 5 • un hidrógeno o un halógeno,
- un radical alquilo,
- un radical aminoalquilo en el que el grupo amino lleva opcionalmente un sustituyente alquilo,
- 10 • un radical alquilamino,
- un radical alquilo que lleva un sustituyente aromático que comprende al menos un átomo N,
- 15 • un radical alquilo que lleva un grupo tioéter aromático. Cuando R¹ y/o R² representan un halógeno, Cl es particularmente preferido.

Cuando R² es un radical alquilo, se prefieren los alquilos que tienen 1 a 6 átomos de carbono.

20 Cuando R² es un radical aminoalquilo, se prefieren los radicales NH₂(CH)_n- en los que n es inferior a 6.

 Cuando R² es un radical alquilaminoalquilo, se prefieren los radicales R'R''N(CH₂)_m- en los que R' y R'' representan independientemente uno del otro H, o un radical alquilo que tiene como máximo 5 átomos de carbono, y m es inferior a 6.

25 Cuando R² es un radical alquilamino, se prefieren los radicales R^cNH- en los que R^c es un cicloalquilo que tiene de 3 a 7 átomos de carbono.

30 Cuando R² es un radical alquilo que lleva un sustituyente aromático que comprende al menos un átomo N, se prefieren los alquilos que tienen como máximo 3 átomos de carbono y que llevan un grupo piridinilo o imidazolilo.

 Cuando R² es un radical alquilo que lleva un grupo tioéter aromático, se prefieren los alquilos que tienen como máximo 3 átomos de carbono y que llevan un grupo feniltio en el que el grupo fenilo lleva opcionalmente un sustituyente halógeno.

35 Entre estos compuestos gem-bifosfónicos, se pueden citar:

- 40 • etidronato (R¹ = OH, R² = CH₃),
- clodronato (R¹ = Cl, R² = Cl),
- pamidronato (R¹ = OH, R² = -CH₂CH₂NH₂),
- 45 • alendronato (R¹ = OH, R² = -(CH₂)₃NH₂),
- risedronato (R¹ = OH, R² = -CH₂-3-piridina),
- tiludronato (R¹ = H, R² = -CH₂-S-C₆H₄-Cl),
- 50 • ibandronato (R¹ = OH, R² = -CH₂-CH₂-N(CH₃)pentilo),
- zoledronato (R¹ = OH, R² = -CH₂-imidazol),
- 55 • incadronato (R¹ = H, R² = -NH-(cicloheptilo)),
- olpadronato (R¹ = OH, R² = CH₂-CH₂-N(CH₃)₂),
- 60 • neridronato (R¹ = OH, R² = -(CH₂)₅NH₂).

Son particularmente preferidos los ácidos en los que R² es un radical alquilo que llevan un sustituyente aromático que comprenden al menos un átomo N, tales como zoledronato o risedronato.

65 Un compuesto fosfocálcico modificado según la invención se caracteriza por la composición química siguiente:



5 [(OA) (OE) P (O) -CR¹R²-P (O) (OA) (OE)]_g, en la que A y E representan H, un metal alcalino, un metal alcalino-térreo o nada, y donde R¹ y R² tienen el significado dado anteriormente, y 0<a<9; 0<b<2; 0<c<5; 0<d<2; 0<e<2; 0<f<2; g<0,5. Cuando A o E representa H, el átomo de oxígeno que lo lleva no está enlazado a la matriz fosfocálcica o está simplemente asociado por enlace de hidrógeno. Cuando A o E es “nada”, el átomo de oxígeno que lo lleva está coordinado a otro elemento de la composición, por ejemplo a un Ca.

10 El contenido de ácido gem-bifosfónico de un compuesto fosfocálcico modificado puede determinarse por espectroscopía UV-visible según el método descrito por Ames, B.N., particularmente en *Methods in Enzymology*, Colowick, S. P. y Kaplan, N. O. Eds., Academic Press, Orlando, 1966, vol. 8, pp. 115-118. Puede determinarse además por RMN líquida ³¹P. La caracterización del compuesto fosfocálcico modificado puede efectuarse esencialmente por RMN del sólido ³¹P MAS que muestra a la vez la presencia del soporte fosfocálcico y la del principio activo.

15 Otro objeto de la invención es una composición utilizable por inyección para el tratamiento de la osteoporosis o de recidivas de tumores líticos por inhibición de la actividad osteoclastica. Dicha composición es una suspensión del compuesto fosfocálcico modificada definido anteriormente en una disolución o un gel biocompatible que presenta una viscosidad que permite el transporte de gránulos de tamaño comprendido entre 40 μm y 500 μm. Como ejemplo, se pueden citar los hidrogeles de interés biológico descritos en *Chem. Rev.* (2001).; 101(7): 1869-1879, particularmente los hidrogeles derivados de la celulosa o a base de hialuronato de sodio.

20 La elección del diámetro de partícula se guía por la cinética de resorción por una parte y por la reología de la inyección por otra parte. Las partículas de diámetro inferior a 40 μm presentan una cinética de bioresorción demasiado rápida y las partículas de diámetro superior a 500 μm presentan problemas de reología en la inyección. Se entiende sin embargo que una baja proporción de partículas (hasta 10% en volumen) puede tener un diámetro inferior a 40 μm o superior a 500 μm. Una composición inyectable según la invención contiene de preferencia de 40% a 75% en masa de compuesto fosfocálcico modificado, de 60% a 25% en masa de hidrogel, y opcionalmente diversos aditivos. Los aditivos se eligen entre los compuestos capaces de introducir diversos iones de interés biológico tales como por ejemplo: K⁺, Na⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, CO₃²⁻, HPO₄²⁻, F⁻ o Cl⁻.

25 La composición puede prepararse metiendo en suspensión en el medio apropiado el compuesto fosfocálcico modificado preparado en una etapa preliminar. Puede prepararse además precipitando el compuesto fosfocálcico modificado *in situ*, a partir de un hidrogel definido como anteriormente y previamente cargado de iones fosfatos (respectivamente calcio) en el que se añadirá una disolución apropiada que contiene iones calcio (respectivamente fosfatos) y la concentración deseada de ácido bifosfónico.

30 El modo de asociación entre la matriz fosfocálcica y el ácido bifosfónico es diferente según la matriz fosfocálcica utilizada, y esta diferencia se traduce en una eficacia biológica diferente durante los ensayos *in vitro* sobre cultivos de osteoclastos.

35 La composición según la invención, en forma inyectable, permite tratar localmente un problema óseo en los principales sitios con riesgos identificados (cuello del fémur y cuerpo vertebral), con ayuda de un principio activo conocido por su utilización por vía sistémica que presenta diversos inconvenientes mencionados anteriormente. Además, la fase fosfocálcica, que juega un papel de vector del principio activo, ejerce un efecto complementario en este sentido que le permite mantener el ácido gem-bifosfónico en su sitio, y que constituye una fuente de calcio y de fosfato necesario para la estimulación del remodelado óseo. La hidroxiapatita (HA) descrita en la técnica anterior como matriz de un implante impregnado de un principio activo no forma parte de los compuestos fosfocálcicos utilizables en la presente invención, porque tiene una solubilidad relativamente baja, posee intrínsecamente un carácter débilmente resorbible, y la introducción del ácido gem-bifosfónico disminuye el potencial de resorbilidad de los compuestos fosfocálcicos de manera general.

Los ejemplos

40 La presente invención se describe con más detalle en los ejemplos siguientes, que se dan a título ilustrativo, pero que no limitan la invención.

Se han utilizado los compuestos y reactivos siguientes:

- 45 ■ agua ultra-pura: agua que tiene una resistividad próxima a 18 MΩ cm
- zoledronato de sodio: ácido gem bifosfónico comercializado por la compañía Novartis
- tiludronato de sodio: ácido gem bifosfónico comercializado por la compañía Sanofi-Synthelabo
- 50 ■ CDA vía NaOH: hidroxiapatita deficiente en calcio obtenida por hidrólisis de fosfato dicálcico dihidratado con una disolución acuosa de NaOH, en forma de gránulos que tienen una granulometría entre 40-80 μm)

ES 2 322 343 T3

- CDA vía amoniaco (hidroxiapatita deficiente en calcio obtenida por hidrólisis de fosfato dicálcico dihidratado con amoniaco), en forma de gránulos que tienen una granulometría entre 40-80 μm
- β -TCP, en forma de gránulos que tienen una granulometría entre 40-80 μm .
- BCP (75% β -TCP/25% HA) en forma de gránulos que tienen una granulometría entre 40-80 μm
- BCP (25% β -TCP/75% HA) en forma de gránulos que tienen una granulometría entre 40-80 μm .

Ejemplo 1

Preparación de un compuesto fosfocálcico modificado

Se ha preparado una suspensión de fosfato de calcio introduciendo 700 mg de BCP que tiene una granulometría de 40-80 μm , en 3,5 ml de agua ultra-pura, y se le añaden 56 mg (0,14 mmol) de zoledronato. Se ha colocado la suspensión en un tubo mantenido a temperatura ambiente, y se ha agitado con un agitador rotativo de 16 tr/min durante 48 h. A continuación, se ha centrifugado la suspensión y se ha separado el residuo sobrenadante.

La fase sólida se ha lavado a continuación varias veces con agua ultra-pura, a continuación se ha filtrado y se ha secado a temperatura ambiente.

El procedimiento se ha realizado igualmente a partir de los compuestos fosfocálcicos siguientes: CDA vía NaOH, CDA vía amoniaco y β -TCP.

Caracterización de los compuestos fosfocálcicos modificados

La cantidad de zoledronato incorporados en cada una de las matrices fosfocálcicas se ha determinado por diferencia, determinando la cantidad de zoledronato presente en el sobrenadante. Esta determinación se ha efectuado, sobre la disolución sobrenadante separado del residuo después de centrifugación, por RMN líquido ^{31}P a partir de curvas de calibración previamente establecidas. Puede efectuarse igualmente por espectroscopía UV-visible según el método citado anteriormente descrito por Ames.

Los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos fosfocálcicos precursores se dan en la tabla a continuación. T (%) indica el contenido de zoledronato en el producto final, expresado en mg de principio activo para 100 mg de compuesto fosfocálcico, y P (%) indica el porcentaje de zoledronato fijado sobre el compuesto con relación a la cantidad introducida en el medio de reacción:

Precursor	T (%)	P (%)
BCP (75% β -TCP / 25% HA)	1	13
BCP (25% β -TCP / 75% HA)	2,7	33
CDA vía NaOH	5,2	65
CDA vía amoniaco	6,4	80
β -TCP	6,4	80

La figura 1 representa el espectro RMN líquido ^{31}P del sobrenadante obtenido después de centrifugación del medio de reacción correspondiente al precursor CDA (vía NaOH). La integración de las señales muestra la abundancia de cada especie y el desplazamiento químico (característico de la especie) se refleja en abscisas. El pico 1 representa el contenido de zoledronato, el pico 2 representa el fosfato insolubilizado en el medio por el compuesto fosfocálcico y el pico 3 representa la referencia NaH_2PO_4 .

ES 2 322 343 T3

El espectro RMN líquido ^{31}P de los compuestos obtenidos a partir de los otros precursores (a excepción de la hidroxiapatita) es análogo y se señala en todos los casos una insolubilización de fosfato durante la reacción.

5 La caracterización de los sólidos obtenidos muestra dos modos de asociación diferentes del zoledronato siguiendo la naturaleza del compuesto fosfocálcico de partida. La figura 2 representa una fotografía por microscopio electrónico de barrido (M.E.B.) efectuada sobre el compuesto de β -TCP. Muestra que una forma de zoledronato (probablemente asociada al calcio cristaliza en la superficie de la matriz fosfocálcica. Se observa el mismo fenómeno en el caso de los BCP, bien sean ricos en β -TCP (75% β -TCP - 25% HA) o pobres en β -TCP (25% β -TCP - 275% HA).

10 Los datos RMN del sólido ^{31}P MAS se representan en la figura 3 para el compuesto resultante de β -TCP. El espectro 1 adquirido en modo CP (Polarización Cruzada) permite observar selectivamente el zoledronato incorporado. Las señales finas dan cuenta de su presencia en una forma cristalina. El espectro 2 registrado en modo desacoplamiento protón permite observar selectivamente el soporte β -TCP no alterado.

15 El espectro RMN del sólido ^{31}P CP-MAS esta representado en la figura 4 para el compuesto resultante de CDA (vía amoniaco). La señal del zoledronato (pico 1) es muy ancha. No se ha detectado ninguna fase cristalina en la superficie del material, lo que indica probablemente una quimisorción del zoledronato en la superficie del CDA. El pico 2 es característico del CDA.

20
Ejemplo 2

Preparación de compuestos fosfocálcicos modificados por tiludronato y ácido metileno bifosfónico

25 Se ha preparado una suspensión de fosfato de calcio introduciendo 700 mg de β -TCP que tiene una granulometría de 40-80 μm , en 3,5 ml de agua ultra-pura, y se le añaden 52,5 mg (0,14 mmol) de tiludronato. Se ha colocado la suspensión en un tubo mantenido a temperatura ambiente, y se ha agitado con un agitador rotativo a 16 tr/min durante 48 h, a continuación se ha centrifugado la suspensión y se ha separado el residuo del sobrenadante.

30 La fase sólida se ha lavado a continuación varias veces con agua ultra-pura, a continuación se ha filtrado y se ha secado a temperatura ambiente.

35 Se observa una reactividad parecida a la registrada con zoledronato. La figura 5 muestra el espectro RMN ^{31}P CP-MAS de β -TCP tratado con tiludronato. El tiludronato puede observarse en forma de una fase cristalina (masiva 1 constituida por señales finas) depositada sobre la fase fosfocálcica (que aparece débilmente (masiva 2) en condiciones de registro del espectro.

40
Ejemplo 3

Preparación de una composición inyectable

45 Se ha preparado una composición inyectable a partir de cada uno de los compuestos modificados obtenidos en los ejemplos 1 y 2, con excepción de los compuestos modificados obtenidos a partir de hidroxiapatita, según el siguiente procedimiento.

50 Para cada compuesto modificado, se han preparado gránulos de los que 95% en volumen tenían un diámetro de partícula equivalente comprendido entre 40 y 80 μm , y se han introducido estos gránulos en una disolución acuosa que contiene 3% de hidroxipropilmetilcelulosa que comprende 21% en masa de grupo metilo y 8% en masa de grupo hidroxipropilo con un grado de polimerización igual a 110, de forma que se obtenga una composición que comprende 49% en masa de gránulos.

55 Cada una de las composiciones preparadas de esta forma se ha introducido en un frasco de vidrio y se ha esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Ejemplo 4

Ensayos in vitro de fosfatos de calcio modificados

60 Células óseas totales, aisladas a partir de huesos largos de conejos recién nacidos, se han utilizado para evaluar la eficacia de la asociación del compuesto fosfocálcico modificado. Se han medido los comportamientos del BCP modificado y CDA vía amoniaco modificado obtenidos en el ejemplo 1 y se han comparado con los del precursor fosfocálcico respectivo no tratado con ácido gem-bifosfónico.

65 Para cada ensayo, se han cargado en un primer pocillo de cultivo dos pastillas de dentina de cachalote (compuesto de referencia para la medida de la resorción) y una pastilla de compuesto fosfocálcico no tratado, y en un segundo pocillo de cultivo, dos pastillas de dentina y una pastilla de compuesto fosfocálcico tratado en superficie.

ES 2 322 343 T3

Se ha evaluado la actividad de resorción de los osteoclastos en estas condiciones de cultivo (después de 5 días) por tres parámetros diferentes:

- 1- El número total de lagunas formadas en la superficie de la dentina de cachalote
- 2- La superficie media de las lagunas
- 3- La superficie de dentina resorbida.

Se ha mostrado que:

- En presencia de pastillas de BCP modificadas con 1% de zoledronato en peso, la actividad de resorción residual de las células óseas del modelo era indetectable. Este fenómeno estaría asociado a una insolubilización importante de zoledronato, que tiene un efecto citotóxico. En efecto, si se pone en agua BCP o β -TCP modificado, un porcentaje significativo de zoledronato cargado pasa rápidamente a disolución. Por ejemplo, 60 mg de β -TCP modificado puestos en suspensión en 1 ml de agua durante 8 horas conducen a la insolubilización de aproximadamente 25% del zoledronato cargado, en decir, una concentración molar de 10^{-2} M.
- En presencia de pastillas de CDA modificadas con 6,4% de zoledronato en peso, se reduce la actividad de resorción de las células aproximadamente 80% con relación al control sin zoledronato. Como en el caso del β -TCP modificado, si se ponen en suspensión 60 mg de CDA modificado en 1 ml de agua durante 8 horas, no se detecta ninguna traza de zoledronato (método UV-visible). Esto implica que el zoledronato solo está potencialmente presente a concentraciones inferiores a 10^{-4} M (límite de detección en nuestras condiciones de análisis).

Estos resultados muestran que los comportamientos del material no son solo el resultado de la única cantidad de zoledronato fijado sobre la matriz fosfocálcica, sino también de la velocidad de insolubilización del zoledronato, y confirman un efecto a distancia de la matriz fosfocálcica modificada.

Ejemplo 5

Varias muestras de CDA (200 mg) modificada por adición de zoledronato conforme al procedimiento del ejemplo 1 y varias muestras de CDA no modificada se han incubado en 5 ml de medio de cultivo a 37°C. Después de 96 horas de incubación, se han recogido los diferentes sobrenadantes y se han utilizado puros, diluidos 10, 100 y 1000 veces en un modelo de osteoclastos de conejos.

Los resultados se representan en la figura 6, en la que se indica en ordenadas en porcentaje de resorción R, estando indicadas las condiciones en abscisas. Entre las condiciones:

- “vehículo” significa el medio de cultivo solo
- “CDA puro” significa el sobrenadante resultante de la incubación de CDA puro en el medio de cultivo; “CDA1/10”, “CDA1/100” y “CDA1/1000” significan respectivamente la disolución designada anteriormente y diluida a 1/10, 1/100 y 1/1000.
- “zo puro” significa una disolución de zoledronato 10^{-6} M en el medio de cultivo, “zo1/10”, “zo1/100”, “zo1/1000” significan respectivamente la disolución designada anteriormente diluida a 1/10, 1/100 y 1/1000.
- “CDAzo puro” significa el sobrenadante resultante de la incubación de CDA cargado de zoledronato en el medio de cultivo “CDAzo1/10”, “CDAzo1/100” y “CDAzo1/1000” significan respectivamente la disolución designada anteriormente y diluida a 1/10, 1/100 y 1/1000.

Estos resultados muestran que:

- el zoledronato liberado por la fase fosfocálcica (CDAzo) conserva su actividad inhibitoria de la resorción osteoclástica con un efecto dosis marcado,
- la CDA sola no parece ejercer influencia sobre la resorción osteoclástica sea cual sea la disolución del sobrenadante, 1
- el zoledronato en disolución (zo) conserva su actividad biológica e inhibe según una relación dosis/efecto de la resorción.

La comparación de los perfiles de inhibición de la resorción osteoclástica provocada por la asociación CDA/Zo y por el zoledronato solo (disolución 10^{-6} M utilizado puro, diluido 10, 100 y 1000 veces) permite sugerir que el material libera una cantidad de zoledronato correspondiente a una concentración total del orden de 10^{-6} M.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de preparación de un compuesto fosfocálcico modificado, **caracterizado** por que consiste en añadir a un ácido gem-bifosfónico o una de sus sales de metal alcalino o alcalino-térreo a una suspensión de un compuesto fosfocálcico precursor en agua ultra-pura, en agitar el medio de reacción a temperatura ambiente, a continuación en recuperar por centrifugación el compuesto formado.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por que los ácidos o las sales utilizados como compuestos gem-bifosfónicos responden a la fórmula $(OY)(OX)P(O)-CR^1CR^2-P(O)(OX)(OY)$ en la que X o Y representan independientemente uno del otro H o un catión de metal alcalino o alcalino-térreo, R^1 representa H, OH o un halógeno, y R^2 representa:

- 15 • un hidrógeno o un halógeno,
- un radical alquilo,
- un radical aminoalquilo en el que el grupo amino lleva opcionalmente un sustituyente alquilo,
- 20 • un radical alquilamino,
- un radical alquilo que lleva un sustituyente aromático que comprende al menos un átomo N,
- un radical alquilo que lleva un grupo tioéter aromático.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que R^1 y/o R^2 representan Cl.

30 4. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que R^2 es un radical que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

5. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que R^2 es un radical aminoalquilo $NH_2(CH)_n-$ en el que n es inferior a 6.

35 6. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que R^2 es un radical alquilaminoalquilo $R'R''N(CH_2)_m-$ en el que R' y R'' representan independientemente uno del otro H o un radical alquilo que tiene como máximo 5 átomos de carbono, y m es inferior a 6.

40 7. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que R^2 es un radical alquilamino R^cNH- en el que R^c es un cicloalquilo que tiene de 3 a 7 átomos de carbono.

8. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que R^2 es un radical alquilo que tiene como máximo 3 átomos de carbono y que lleva un grupo piridinilo o imidazolilo.

45 9. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que R^2 es un radical alquilo que tiene como máximo 3 átomos de carbono y que lleva un grupo feniltio en el que el grupo fenilo lleva opcionalmente un sustituyente halogenado.

50 10. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por que R^1 es OH, R^2 es $-CH_2$ -imidazol, A y E representan H.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por que el compuesto formado se purifica por lavado con agua ultra-pura, seguido de una filtración y de un secado al aire a temperatura ambiente.

55 12. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por que el compuesto fosfocálcico se elige entre BCP, CDA que es una hidroxiapatita deficiente en calcio y β -TCP.

13. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por que la agitación a temperatura ambiente se mantiene durante 1 h y 72 h.

60 14. Compuesto fosfocálcico modificado susceptible de ser obtenido por el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13.

65 15. Compuesto fosfocálcico modificado según la reivindicación 14, en el que el compuesto fosfocálcico se elige entre BCP, CDA que es una hidroxiapatita deficiente en calcio y β -TCP.

16. Composición utilizable por inyección para el tratamiento de la osteoporosis o de recidivas de tumores líticos por inhibición de la actividad osteoclástica, **caracterizada** por que está constituida por una suspensión de 40 a 75%

ES 2 322 343 T3

en masa del compuesto fosfocálcico modificado según una de las reivindicaciones 14 o 15, en 60 a 25% en masa de un hidrogel.

5 17. Composición según la reivindicación 16, **caracterizada** por que el gel biocompatible es un hidrogel de interés biológico.

18. Composición según la reivindicación 17, **caracterizada** por que el gel es un hidrogel derivado de la celulosa o un gel a base de hialuronato de sodio.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

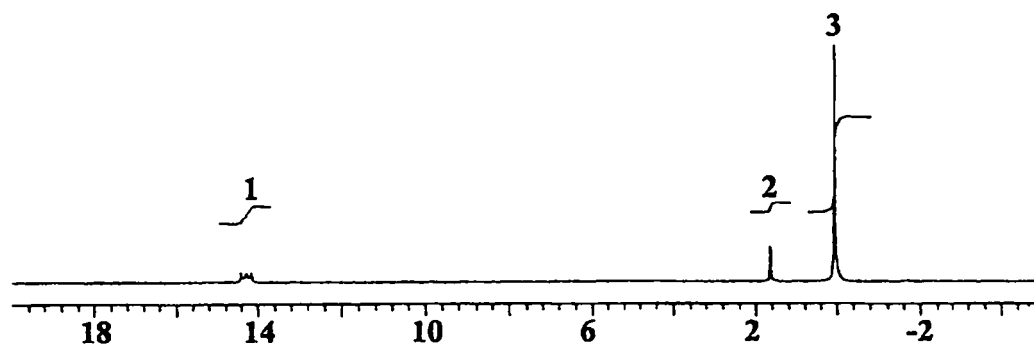


fig. 2

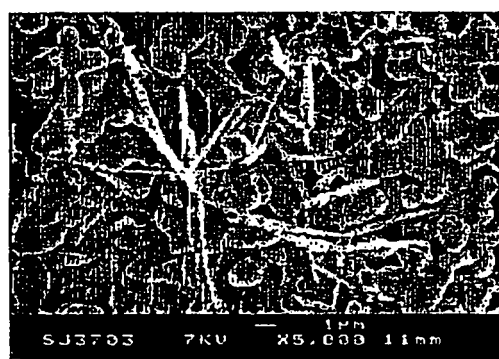


Fig. 3

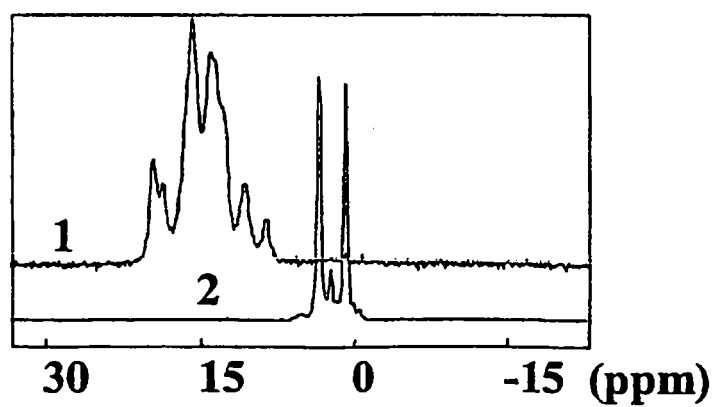


Fig. 4

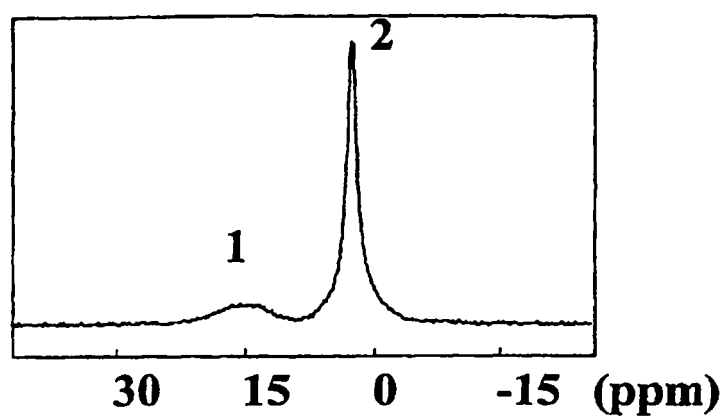


Fig. 5

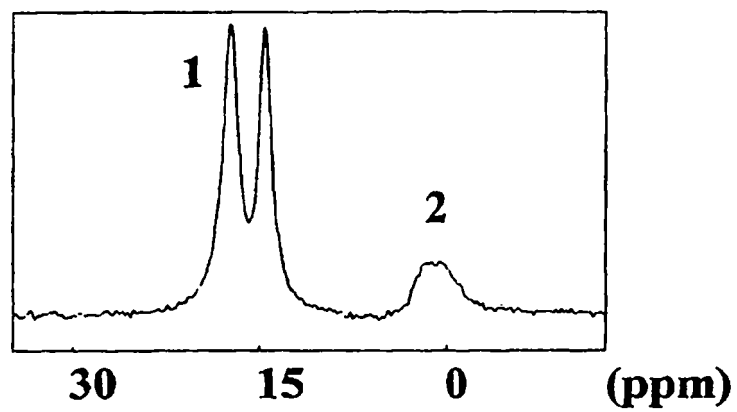


Fig. 6

