



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0210282-0 B1



(22) Data de Depósito: 06/06/2002

(45) Data da Concessão: 11/08/2015
(RPI 2327)

(54) Título: Composições compreendendo veículos de distribuição de fosfato de cálcio para proteínas osteoindutivas, e respectivo uso

(51) Int.Cl.: A61K31/70; A61K33/06; A61K33/14; A61K33/42; A61K38/00

(30) Prioridade Unionista: 08/06/2001 US 60/296,818

(73) Titular(es): Etex Corporation, Wyeth

(72) Inventor(es): Aliassghar Tofighi, Howard Joel Seeherman, Rebecca Hung-Mei Li

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO VEÍCULOS DE DISTRIBUIÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA PROTEÍNAS OSTEOINDUTIVAS, E RESPECTIVO USO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 Esta invenção refere-se aos materiais compósitos contendo fosfato de cálcio, úteis como veículos de distribuição para proteínas osteoindutivas. A invenção adicionalmente refere-se aos compósitos osteoindutivos, biocompatíveis, que podem ser usados para a regeneração do osso e o aumento do osso, bem como para a restauração do tecido e o reforço em fraturas ósseas, implantes dentários, implantes ósseos e próteses e similares.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 Muita pesquisa na área de biofarmacêuticos está dirigida para o desenvolvimento de veículos implantáveis eficazes para a distribuição de drogas e outras aplicações cirúrgicas. Tais veículos devem ser biocompatíveis e também devem ser capazes de proteger a atividade de qualquer agente biologicamente ativo que eles sejam pretendidos de distribuir. Muitos agentes biologicamente ativos são instáveis e perdem facilmente a atividade quando eles são incorporados em um material de distribuição. A preservação da atividade protéica tem criado problemas particularmente difíceis.

20 Na área de distribuição de drogas, as cerâmicas de fosfato de cálcio têm sido estudadas como veículos potenciais de distribuição, devido a sua biocompatibilidade bastante conhecida e a sua afinidade por reagentes protéicos (ver, por exemplo, Ijntema et al., *Int. J. Pharm.* **112**:215 (1994); Itokazu et al., *J. Orth. Res.* **10**:440 (1992); Shinto et al., *J. Bone Joint Surg.* **74-B**:600 (1992); e Uchida et al., *J. Orth. Res.* **10**:440 (1992)). A maior parte destes materiais tem estado na forma de hidroxiapatita sinterizada, pré-fabricada, nas formas de grânulos ou de blocos. Estas preparações têm diversas desvantagens, incluindo uma capacidade limitada de conformar-se aos defeitos esqueléticos, particularmente no caso dos blocos; uma integridade estrutural inadequada dos grânulos (que não se ligam conjuntamente);

30 e uma dificuldade em modelar o implante ao formato do tecido esquelético que falta tanto com os blocos quanto com os grânulos. A forma de blocos da

hidroxiapatita proporciona suporte estrutural, porém, entre outras complicações, deve ser mantida no local por meios mecânicos, o que limita bastante o seu uso e os seus resultados cosméticos. Também, é muito difícil serrar um bloco de hidroxiapatita em um formato que se adapte ao defeito individual do paciente. A forma granular produz resultados cosmeticamente melhores, porém tem uma estabilidade estrutural muito limitada e é difícil de conter durante e após um procedimento cirúrgico. Em geral, todos estes produtos são cerâmicas, produzidos por sinterização em altas temperaturas, e não são individualmente cristalinos, porém, em vez disso, têm as suas vizinhanças de cristais fundidas conjuntamente. A maior parte dos materiais do tipo cerâmica é, em geral, funcional e biologicamente não-absorvível (tendo uma taxa de absorção geralmente não excedendo na ordem de 1% por ano).

Um material não-reabsorvível, poroso, baseado em coral, permite o intercrescimento com o osso, porém, no fim, torna-se somente aproximadamente 20% de osso, com os 80% restantes subsistindo como tecido de cicatriz. O HA RESORB® feito pela Osteogen é uma forma de hidroxiapatita absorvível, porém não é um cimento. Ele é granular e não adesivo. O HA RESORB® é acondicionado livremente, em vez de adesivamente, no local. Para grandes usos, ele é substituído pelo osso muito rapidamente. No mercado de materiais dentários, o HAPSET® é uma composição de grânulos de fosfato de cálcio e gesso-de-paris cimentável (sulfato de cálcio). Este material não é verdadeiramente uma hidroxiapatita e contém muito sulfato de cálcio para a maior parte dos usos biológicos. O componente de sulfato de cálcio de uma tal composição é reabsorvível, porém não os grânulos de fosfato de cálcio.

Pelo menos uma classe de composições de fosfato de cálcio é precursora para a formação de hidroxiapatita e são biologicamente compatíveis, e tem duas propriedades únicas que não são atingidas em outros biomateriais de fosfato de cálcio: (1) auto-endurecimento para formar uma massa com resistência suficiente para muitas aplicações médicas e dentárias, e (2) quando implantado no osso, o material reabsorve lentamente e é completamente substituído por formação de osso novo, sem nenhuma perda no

volume ou na integridade do tecido que recebe o implante. Ver as Patentes. U.S. N^{os} Re. 33.221 e Re. 33.161 para Brown e Chow, que ensinam a preparação de composições de remineralização de fosfato de cálcio e de um material de hidroxiapatita gradualmente reabsorvível, não-cerâmico, finamente cristalino, baseado na mesma composição de fosfato de cálcio.

Um sistema de fosfato de cálcio virtualmente idêntico, que consiste em fosfato de tetracálcio (TTCP) e fosfato de monocálcio (MCP) ou sua forma de monohidrato (MCPM), foi descrito por Constantz et al. (Patentes. U.S. N^{os} 5.053.212 e 5.129.905). Este sistema envolve, em um modo relatado, a conversão do MCP em fosfato de dicálcio, que reage com o TTCP e forma a hidroxiapatita (HA), o componente mineral principal dos dentes e osso, como o produto final.

Um outro tipo de composição de fosfato de cálcio compreende um fosfato de cálcio apatítico, amorfo, como um reagente, um promotor, e um líquido aquoso para formar uma pasta de endurecimento. Ver, por exemplo, as Patentes. U.S. N^{os} 5.650.176; 5.676.976; 5.683.461; 6.027.742; e 6.117.456 para Lee et al. Este sistema proporciona um material cerâmico bioativo que é biocompatível, biorreabsorvível e trabalhável por longos períodos de tempo, na temperatura ambiente. O material cerâmico bioativo pode ser formado em baixas temperaturas, é prontamente moldável e/ou injetável, e ainda pode endurecer até uma alta resistência com reação adicional. O material cerâmico bioativo contém sólidos de fosfato de cálcio apatítico pobremente cristalinos, com razões de cálcio para fosfato (Ca/P) comparáveis aos minerais dos ossos de ocorrência natural e tendo rigidez e resistência à fratura similares ao osso natural. O material compósito cerâmico bioativo é fortemente biorreabsorvível e a sua capacidade de bioabsorção e a reatividade podem ser ajustadas para atender as demandas da terapia e/ou do local do implante particulares. O material pode ser preparado como placas de ossos, parafusos de ossos e outras fixações e dispositivos médicos, incluindo as aplicações veterinárias, que são fortemente biorreabsorvíveis e/ou ossificantes.

Um dos objetivos da cirurgia de reconstrução é ser capaz de

substituir o tecido danificado por tecido novo, usando as próprias células de um paciente ou proteínas que aumentam o crescimento. Por exemplo, os pesquisadores têm se esforçado para desenvolver sistemas de regeneração de cartilagem, nos quais os condrócitos isolados são injetados em uma área danificada no contexto de uma base de polímero (ver, por exemplo, Atala et al., *J. Urol.* **150**:747 (1993); Freed et al., *J. Cell. Biochem.* **51**:257 (1993) e as referências citadas no mesmo). Sistemas de base semeados similares têm sido estudados no contexto de restauração do osso, onde as células de osteoblastos são utilizadas em conjunção com os suportes poliméricos ou cerâmicos (ver, por exemplo, Elgendy et al., *Biomater.* **14**:263 (1993); Ishaug et al., *J. Biomed. Mater. Res.* **28**:1445 (1994)). De interesse particular são os materiais osteoindutivos, tais como as proteínas morfogenéticas do osso (por exemplo, a BMP-2 humana recombinante), a matriz do osso desmineralizado; os fatores de crescimento de transformação (por exemplo, o TGF- β); e as diversas outras espécies orgânicas sabidas induzir a formação de osso.

Três tipos gerais de materiais de base baseados em fosfato de cálcio foram projetados especificamente para uso com as composições semeadas. Um tipo de material de base consiste em grânulos pré-formados à base de fosfato de cálcio, com a substância bioativa ligada sobre a superfície externa. Em geral, são requeridos grânulos grandes (idealmente 100-1000 μ) para evitar fazer surgir respostas inflamatórias. Entretanto, tais grânulos grandes pré-fabricados não são facilmente injetáveis através das pequenas agulhas de calibração para a injeção percutânea. Além disso, os fatores somente podem ser misturados com os grânulos pré-formados, resultando no revestimento da superfície, em vez do fator ser incluído ou dispersado por toda a matriz. A inclusão do fator permite uma liberação mais controlada das biomoléculas à medida que a matriz é reabsorvida. Os grânulos pré-formados são tipicamente difíceis de manusear e aplicar. Além disso, a maior parte dos grânulos de hidroxiapatita pré-formados é produzida por um processo de sinterização, tornando-os essencialmente não-reabsorvíveis.

Um segundo tipo de material de base para as composições se-

meadas consiste em blocos porosos implantáveis de hidroxiapatita ou fosfato de tricálcio. Os blocos porosos implantáveis podem ser preparados com graus variados de porosidade, tipicamente usando uma mistura seca de reagentes de tamanho de partícula controlado. Os outros métodos de promover a porosidade incluem a causticação e a lixiviação químicas ou físicas. Embora eles geralmente proporcionem suporte suficiente, os blocos porosos têm diversas desvantagens significativas. Primeiramente, como os grânulos pré-fabricados descritos acima, as bases de blocos não têm a substância osteoindutiva incluída por todo o volume, e, assim, impedem a liberação controlada da substância ativa. Em segundo lugar, os blocos implantáveis não são injetáveis, e, desse modo, requerem um procedimento de implantação mais intrusivo. Finalmente, e de modo importante, os blocos monolíticos podem retardar a taxa de formação óssea para aplicações clínicas onde uma aceleração da cura for desejada sobre o curso normal de tempo de cura. Este retardo pode ser devido à lenta reabsorção do veículo sólido e à liberação retardada subsequente da substância ativa. A presença da matriz monolítica pode também obstruir a migração e a infiltração das células no local da fratura. Assumindo que a matriz de bloco contém canais de interconexão entre os poros, o crescimento do osso novo será ditado pelos poros e limites das paredes das bases, assim limitando a formação de osso novo.

Um terceiro tipo de material de base envolve os cimentos de fosfato de cálcio. Diferentes dos grânulos pré-fabricados e dos blocos monolíticos, os cimentos são prontamente injetáveis e podem ter a substância osteoindutiva incluída por todo o volume. Entretanto, estes cimentos tendem a formar agregados monolíticos que são inerentemente microporosos. Embora as versões macroporosas usando formadores de poros biodegradáveis tenham sido descritas (ver, por exemplo, o pedido PCT Nº WO 98/16209, que é incorporado aqui por referência), estes cimentos formam bases monolíticas que contêm canais em vez de grânulos microporosos, os quais, como acima discutido, restringem significativamente o crescimento de osso novo.

Desse modo, apesar dos esforços substanciais neste campo, permanece uma necessidade por um veículo de distribuição de drogas que

seja biocompatível, prontamente reabsorvível, e não-prejudicial para a atividade da droga. Idealmente, o veículo deve ser injetável; maleável para capacitar a injeção ou a implantação nas diversas fraturas e defeitos dimensionados; promover a distribuição homogênea de materiais bioativos por toda a matriz, assim permitindo a liberação controlada da substância ativa; e, finalmente, formar macrogrânulos discretos com a administração ao local cirúrgico ou defeituoso. A granulação é desejável para facilitar a migração e a infiltração das células para a secreção da matriz óssea extracelular, e proporcionar acesso para a vascularização. Os grânulos também proporcionam alta área de superfície para a reabsorção e a liberação aumentadas da substância ativa, bem como uma interação célula-matriz aumentada. A presente invenção resolve estas necessidades, proporcionando materiais e composições úteis na distribuição de drogas e na restauração do tecido.

Sumário da Invenção

Em uma modalidade, a invenção proporciona uma composição para o tratamento de um mamífero tendo um defeito no osso, compreendendo um material de fosfato de cálcio, uma quantidade eficaz de um agente efervescente, e um agente biologicamente ativo. O material de fosfato de cálcio pode ser um fosfato de cálcio apatítico amorfo, a hidroxiapatita, o fosfato de tricálcio, ou a fluorapatita. Em uma modalidade preferida, o material de fosfato de cálcio é um fosfato de cálcio apatítico amorfo, por exemplo um fosfato de cálcio apatítico pobremente cristalino. O fosfato de cálcio apatítico pobremente cristalino pode ter uma razão de cálcio para fosfato (Ca:P) comparável aos minerais dos ossos de ocorrência natural. Nas modalidades preferidas, a razão de Ca:P é menos do que 1:1,50, preferivelmente cerca de 1:1,40. A proteína osteogênica pode ser um membro da família da proteína morfogênica óssea (BMP), incluindo a BMP-2, a BMP-4, a BMP-5, a BMP-6, a BMP-7, a BMP-10, a BMP-12 e a BMP-13. Em uma modalidade preferida, a proteína osteogênica é a a BMP-2 ou a BMP-6. O agente efervescente pode ser um gás selecionado do grupo consistindo em dióxido de carbono, ar, nitrogênio, hélio, oxigênio, e argônio. Em uma modalidade preferida, o efervescente é o bicarbonato de sódio. O bicarbonato de sódio pode

estar presente em uma concentração de entre cerca de 10 e cerca de 40 por cento (p/p). A composição pode adicionalmente compreender um ou mais materiais suplementares, tais como os sais farmacologicamente aceitáveis, os polissacarídeos, os peptídeos, as proteínas, os aminoácidos, os polímeros sintéticos, os polímeros naturais, e os tensoativos; as estruturas sólidas, tais como as esponjas, as malhas, os filmes, as fibras, os géis, os filamentos, as micropartículas, e as nanopartículas; os polímeros biodegradáveis, tais como o colágeno, o glicogênio, a quitina, as celuloses, o amido, as ceratinas, a seda, os ácidos nucleicos, a matriz óssea desmineralizada, o ácido hialurônico derivado, os polianidridos, os poliortoésteres, o ácido poliglicólico, o ácido polilático, e os seus copolímeros e derivados; os ácidos α -hidroxicarboxílicos, tais como a poli(L-lactida) (PLLA), a poli(D,L-lactida) (PDLLA), a poliglicolida (PGA), a poli(lactida-co-glicolida) (PLGA), o poli(D,L-lactida-co-carbonato de trimetileno), e o poli(hidroxibutirato) (PHB), e os polianidridos, e os seus copolímeros e derivados: o SiO_2 , o Na_2O , o CaO , o P_2O_5 , o Al_2O_3 e o CaF_2 ; e os polissacarídeos, os peptídeos e os ácidos graxos. A composição pode adicionalmente compreender um segundo agente ativo, tal como uma proteína Hedgehog, Frazzled, Chordin, Noggin, Cerberus e Follistatin.

Em um outro aspecto, a invenção relaciona-se a um método de tratar um mamífero tendo um defeito no osso, compreendendo administrar ao local do defeito no osso uma quantidade eficaz de uma composição osteogênica, em que a composição osteogênica compreende uma proteína morfogenética óssea, um material de fosfato de cálcio, e um agente efervescente. Em uma modalidade preferida, o agente efervescente é o bicarbonato de sódio.

Em mais um outro aspecto, a invenção relaciona-se ao uso de uma proteína osteogênica, um material de fosfato de cálcio, e um agente efervescente na preparação de um medicamento para a distribuição de proteínas osteogênicas.

30 **Descrição Detalhada da Invenção**

A presente invenção é dirigida às composições osteoindutivas, adaptadas para uso na restauração, regeneração e aumento do tecido ós-

seo. A composição compreende um material de fosfato de cálcio biocompatível e biorreabsorvível, um agente efervescente, e um agente biologicamente ativo. Com o endurecimento, o material de fosfato de cálcio proporciona uma base reabsorvível para o crescimento de osso novo. O agente efervescente impede que o fosfato de cálcio forme uma estrutura monolítica unitária facilitando a formação de macrogrânulos discretos, os quais dispersam-se durante o endurecimento do fosfato de cálcio. O agente biologicamente ativo estimula a atividade osteogênica aumentada das células progenitoras presentes ou que se infiltram, ou de outras células. As composições osteoindutivas são úteis para o aumento e a regeneração ósseos do tecido ósseo, por exemplo em osso osteopênico, bem como para a restauração e o reforço do tecido em fraturas ósseas, implantes dentários e próteses e similares.

Como usado aqui, um "material de fosfato de cálcio" significa um material substituto do osso, sintético, compreendendo o fosfato de cálcio como o componente principal. Os materiais adequados à base de fosfato de cálcio são bastante conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, o fosfato de cálcio apatítico amorfo, a hidroxiapatita, o fosfato de tricálcio, e a flúorapatita. Em uma modalidade preferida, o material de fosfato de cálcio é um sólido de fosfato de cálcio apatítico pobremente cristalino, tendo uma razão de cálcio para fosfato (Ca/P) comparável aos minerais dos ossos de ocorrência natural. Tais materiais podem ser produzidos usando uma combinação de fosfato de cálcio apatítico, amorfo, como um reagente, um promotor, e um líquido aquoso para formar uma pasta de endurecimento. Em uma modalidade alternativa, o material de fosfato de cálcio é produzido por reação ácido-base no estado sólido de reagentes de fosfato de cálcio cristalinos para formar sólidos de hidroxiapatita cristalinos.

O "agente efervescente" refere-se a uma substância gasosa ou uma substância, a qual produz borbulhamento, espumação ou liberação de um gás.

Como usado aqui, "amorfo" significa um material com caráter amorfo significativo. O caráter amorfo significativo contempla mais do que

75% de teor amorfo, preferivelmente mais do que 90% de teor amorfo, e é distinguido por um padrão de difração de raios X não-caracterizado, amplo.

"Bioativo" refere-se a um material que induz a formação de tecido duro no, ou em torno do, implante. Quando implantado no tecido macio, a bioatividade pode também requerer a presença de um fator de crescimento ou trófico, ou a semeadura do implante com um tipo de célula formadora de tecido duro.

O termo "biocompatível", como usado aqui, significa que o material não faz surgir uma resposta prejudicial substancial no hospedeiro. Há sempre preocupação, quando um objeto estranho é introduzido em um corpo vivo, que o objeto induzirá uma reação imune, tal como uma resposta inflamatória que terá efeitos negativos sobre o hospedeiro. Por exemplo, embora a hidroxiapatita seja geralmente considerada ser "biocompatível", uma inflamação e uma necrose do tecido significativas têm sido observadas quando os microcarreadores de hidroxiapatita cristalinos são inseridos de modo intramuscular nos animais (ver, por exemplo, IJntema et al., *Int. J. Pharm.* **112**:215 (1994)).

"Biorreabsorvível" refere-se à capacidade de um material de ser reabsorvido in vivo. O processo de reabsorção envolve a eliminação dos materiais de implantes originais através da ação de fluidos corpóreos, enzimas ou células. O fosfato de cálcio reabsorvido pode, por exemplo, ser depositado novamente como mineral do osso, ou sendo de outro modo reutilizado dentro do corpo, ou excretado. "Fortemente biorreabsorvível", como este termo é usado aqui, significa que pelo menos 80% da massa total de material implantado de modo intramuscular ou subcutâneo é reabsorvida dentro de um ano. Nas modalidades preferidas, o material será reabsorvido dentro de nove meses, seis meses, três meses, e idealmente um mês.

Uma "quantidade eficaz" de um agente efervescente é uma quantidade suficiente para efetuar a formação de macrogrânulos com o endurecimento, e dependerá do material de fosfato de cálcio que está sendo usado. Geralmente, a quantidade de agente efervescente é adicionada em uma faixa de cerca de 1 a 90 por cento em peso, preferivelmente cerca de 1

a 50 por cento em peso, e mais preferivelmente cerca de 10 a 40 por cento em peso.

Como usado aqui, um "macrogrânulo" significa um grânulo ou partícula de entre cerca de 100 micra e 1 milímetro de diâmetro. O material macrogranular formado com o endurecimento da composição de fosfato de cálcio inventiva é biocompatível (isto é, os macrogrânulos são de tamanho suficiente para evitar fazer surgir uma resposta inflamatória) e macroporoso, como descrito abaixo.

Como usado aqui, "macroporoso" refere-se a um material de fosfato de cálcio endurecido, tendo poros de diâmetro suficiente para permitir a migração e a infiltração das células. Em uma modalidade preferida, o material macroporoso formado de acordo com a presente invenção tem um diâmetro de poro de mais do que 30 micra, mais preferivelmente entre cerca de 30 e 200 micra, e mais preferivelmente ainda entre cerca de 50 e 100 micra de diâmetro. O material macroporoso da presente invenção facilita a migração e a infiltração das células para a secreção da matriz óssea extracelular, bem como o aumento das interações entre célula-matriz.

Uma "quantidade eficaz" de um agente biologicamente ativo é uma quantidade suficiente para estimular a atividade osteogênica aumentada de células progenitoras presentes ou que se infiltram, ou de outras células. A quantidade dependerá do tamanho e da natureza do defeito que está sendo tratado, bem como da composição do material de fosfato de cálcio que está sendo empregado. Geralmente, a quantidade de agente biologicamente ativo a ser distribuído está em uma faixa de cerca de 0,1 a cerca de 100 mg, preferivelmente cerca de 1 a cerca de 100 mg; e mais preferivelmente ainda cerca de 10 a cerca de 80 mg.

Uma "quantidade eficaz" de um material suplementar é uma quantidade eficaz para conferir a propriedade mecânica ou química desejada ao compósito.

"Endurecimento" refere-se ao processo pelo qual a composição de fosfato de cálcio maleável é transformada em um material de fosfato de cálcio endurecido. O material de fosfato de cálcio é considerado estar "endu-

recido" quando ele for um sólido substancialmente não-moldável. Um tal material de fosfato de cálcio endurecido tem compressibilidade mínima e tende a sofrer deformação plástica, em oposição à elástica.

O "fosfato de cálcio apatítico pobremente cristalino", o "fosfato de cálcio PCA" e o "material PCA", como estes termos são usados aqui, descrevem um fosfato de cálcio apatítico pobremente cristalino, sintético. O material apatítico pobremente cristalino (PCA) não está necessariamente restringido a uma fase única de fosfato de cálcio, desde que tenha o padrão característico de difração de raios X (XRD) e de FTIR. Um fosfato de cálcio PCA tem substancialmente o mesmo espectro de XRD que o osso. O espectro é geralmente caracterizado por somente dois picos amplos na região de 20-35°, com um centrado em 26° e o outro centrado em 32°, e por picos de FTIR a 563 cm⁻¹, 1034 cm⁻¹, 1638 cm⁻¹ e 3432 cm⁻¹ (± 2 cm⁻¹). Ombros bem-definidos são observados a 603 cm⁻¹ e 875 cm⁻¹, com um dublete tendo máximo em 1422 cm⁻¹ e 1457 cm⁻¹.

O "precursor hidratado", como usado aqui, refere-se à pasta ou massa formada por hidratação dos precursores PCA secos, na presença de uma quantidade limitada de solução aquosa (isto é, menos do que aproximadamente 1 ml de solução aquosa/1 g de pó de precursor). O precursor hidratado pode compreender tanto os reagentes quanto os produtos, em diversas combinações, dependendo do grau até o qual a conversão progrediu. Ambas as pastas precursoras PCA "injetáveis" e "moldáveis" descritas aqui são precursores hidratados. Os precursores hidratados "injetáveis" preferidos têm uma consistência apropriada para a distribuição através de uma agulha hipodérmica de calibração 18.

O termo "promotor", como usado aqui, descreve um material ou tratamento que promove o endurecimento de um precursor hidratado e pode aumentar a conversão de fosfato de cálcio amorfo (ACP) em fosfato de cálcio PCA. Alguns promotores participam na conversão e são incorporados no material PCA; outros, conhecidos como promotores "passivos", não estão envolvidos na conversão.

"Reativo" é usado aqui para referir-se à capacidade de um fos-

fato de cálcio, quando misturado com um líquido para formar um precursor hidratado, de sofrer conversão no material PCA, na presença de um promotor, em associação com o endurecimento dos materiais precursores. Os ACPs preferidos são caracterizados por uma capacidade de converter-se completamente, uma capacidade de converter-se rapidamente com o endurecimento, uma capacidade de sofrer conversão com compostos de outro modo inertes e/ou uma capacidade de converter-se em um material PCA substancialmente homogêneo. Onde o ACP for reagido com um segundo fosfato de cálcio, a "conversão" pode incluir a conversão tanto do ACP quanto do segundo fosfato de cálcio. O grau de endurecimento e a cinética do processo de endurecimento são também elementos importantes da reatividade. Alguns ACPs são mais reativos do que outros. Um ACP é considerado "altamente reativo" se ele sofrer conversão e endurecimento até um material PCA na presença de um promotor fraco, tal como o diidrato de fosfato de dicálcio (DCPD). Os ACPs altamente reativos preferidos produzem um material PCA endurecido na presença de DCPD fracamente promotor e água, a 37°C, em menos do que doze horas, com o endurecimento estando substancialmente completo em torno de uma a cinco horas, e idealmente 10-30 minutos.

20 O Material de Fosfato de Cálcio

O componente de fosfato de cálcio da presente invenção pode ser qualquer material de fosfato de cálcio, biocompatível, conhecido na técnica. O material de fosfato de cálcio pode ser produzido por qualquer uma de uma variedade de métodos e usando quaisquer componentes de partida adequados. Por exemplo, o material de fosfato de cálcio pode ser produzido usando uma combinação de fosfato de cálcio apatítico, amorfo, como um reagente, um promotor, e um líquido aquoso para formar uma pasta de endurecimento. Alternativamente, o material de fosfato de cálcio pode ser produzido por reação ácido-base em estado sólido de reagentes de fosfato de cálcio cristalino, para formar sólidos cristalinos de hidroxiapatita. Os outros métodos de preparar materiais de matriz de fosfato de cálcio são conhecidos na técnica.

Fosfato de cálcio apatítico pobremente cristalino (PCA)

Em uma modalidade, o material de fosfato de cálcio é o fosfato de cálcio apatítico pobremente cristalino (PCA). O material PCA é descrito no pedido U.S.S.N. 08/650.764 e na Patente U.S. Nº 5.650.176, ambos os
5 quais são pelo presente incorporados por referência em suas totalidades aqui. O material é também descrito em um grupo de pedidos relacionados, intitulados "Delivery Vehicle", "Conversion of Amorphous Calcium Phosphate to Form a Novel Bioceramic", "Orthopedic and Dental Ceramic Implants" e "Bioactive Ceramic Composites", cada um dos quais foi depositado em 16 de
10 outubro de 1997, e cedidos para ETEX Corporation (Cambridge, MA), e é incorporado aqui por referência. Levando-se em conta a amplitude de descrições em cada um destes pedidos relacionados, os detalhes dos materiais PCA não serão batidos aqui. Um resumo de suas características será suficiente.

15 O material PCA é caracterizado por sua capacidade biológica de reabsorção e sua cristalinidade mínima. O seu caráter cristalino é substancialmente o mesmo que o osso natural. O material PCA também é biocompatível e não é prejudicial para o hospedeiro.

O material PCA pode ser implantado em um paciente em uma
20 forma de pasta ou massa (isto é, como um precursor hidratado). Visto que a reação inventiva que produz o material de fosfato de cálcio macroporoso, homogêneo, pode ser iniciada fora do corpo, e processa-se lentamente na temperatura ambiente, a possibilidade que o material "estabelecer-se-á" antes da aplicação ao local cirúrgico e tornar-se-á inutilizável é minimizada. A
25 reação acelera-se significativamente sob as condições fisiológicas (isto é, a temperatura e a pressão do corpo) e o material endurece no local. Esta característica é particularmente útil no endurecimento cirúrgico, onde o encaixe sob medida do dispositivo à posição do implante é tipicamente requerido. Por exemplo, a pasta PCA contendo o agente efervescente e o agente bio-
30 logicamente ativo pode ser aplicada a, e usada para encher, um local de fratura.

Alternativamente, o material PCA pode ser pré-endurecido fora

do corpo, carregado com o agente biologicamente ativo e o agente efervescente desejados, e implantado em um tempo posterior. Esta abordagem é útil naquelas situações onde os formatos sob encomenda não são essenciais, e onde a produção de grandes números de implantes é desejada.

5 Geralmente, a reação de formação da presente invenção é completada após a aplicação ao local cirúrgico. O material tipicamente endurece em menos do que cinco horas, e substancialmente endurece em torno de uma a cinco horas, sob condições fisiológicas. De preferência, o material é substancialmente endurecido dentro de cerca de 10-30 minutos. A consis-
10 tência e a capacidade de formação do material PCA, bem como a velocidade da reação de formação, podem ser variadas de acordo com a necessidade terapêutica modificando-se alguns parâmetros simples (ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 6.027.742 para Lee et al., que é incorporada por referência em sua totalidade aqui).

15 A reação de conversão que produz o material PCA pode ser iniciada por adição de água destilada a uma mistura dos componentes precursores secos, para formar um precursor hidratado espesso na forma de uma pasta ou massa. Outros agentes aquosos, tais como os tampões, a solução salina, o soro ou o meio de cultura de tecido, podem ser usados no lugar da
20 água destilada. Em outras modalidades, pode ser adicionada água suficiente aos pós precursores para formar uma pasta, a qual, com a adição dos outros componentes da invenção, é prontamente injetável com uma agulha de calibração 18. Mais freqüentemente, o material de fosfato de cálcio biorreabsorvível resultante será "deficiente de cálcio", com uma razão de cálcio para
25 fosfato de menos do que 1,5 em comparação com o valor estequiométrico ideal de aproximadamente 1,67 para a hidroxiapatita.

Os materiais PCA adequados podem ser identificados combinando-se os precursores PCA, hidratando-se com uma quantidade limitada de água (de modo que seja formada uma pasta ou massa), e permitindo-se
30 o endurecimento até um material PCA. Os precursores desejáveis são capazes de endurecimento em um ambiente úmido na, ou aproximadamente na, temperatura ambiente, em menos do que 5 horas e preferivelmente dentro

de 10-30 minutos. Os componentes que endurecem neste modo podem então ser colocados de forma intramuscular ou subcutânea em um animal de teste e checados quanto à capacidade biológica de reabsorção. Os materiais desejáveis são aqueles que, quando implantados como um pélete de 1-5 g, são pelo menos 80% reabsorvidos dentro de um ano. De preferência, o material pode ser inteiramente reabsorvido. Geralmente, é mais fácil testar a reabsorção das quantidades em grama de material em locais subcutâneos.

O material PCA pode ser formado em uma reação que emprega pelo menos um precursor de fosfato de cálcio amorfo (ACP), e preferivelmente emprega um ACP ativado ou reativo (ver, por exemplo, o pedido PCT N° WO 98/16209; Exemplos 1-4). Em alguns casos, a reação pode empregar somente um ACP precursor, o qual é convertido, em um modo controlado, em parte ou inteiro, no material PCA. Também, um promotor não-participante pode ser empregado para facilitar a conversão do ACP ativado no material PCA. Em qualquer caso, as reações que podem ser iniciadas fora do corpo, que podem ser realizadas em uma configuração semelhante a uma pasta, e que aceleram significativamente a 37°C, resultando em um produto de fosfato de cálcio endurecido, são bastante preferidas.

A conversão de ACP em material PCA é promovida na presença de água. Geralmente, o ACP é proporcionado como um pó e combinado com quaisquer outros reagentes (por exemplo, um segundo fosfato de cálcio), e é exposto a uma quantidade limitada de água, de modo que uma pasta ou massa seja formada. O precursor hidratado então endurece, e o endurecimento está associado com a formação do material PCA. A conversão de ACP em fosfato de cálcio PCA processa-se em um modo controlado, como uma pasta ou massa, que endurece em um modo capaz de ser predito e que tem utilidade em aplicações dentárias, ortopédicas, ou outras aplicações terapêuticas.

Quando o fosfato de cálcio amorfo for usado como o único precursor para produzir um material PCA reabsorvível, é importante controlar a tendência natural do ACP a converter-se em hidroxiapatita altamente cristalina. Por outro lado, o curso de tempo da conversão deve ser rápido o sufici-

ente para ter utilidade cirúrgica. Uma abordagem é combinar um ACP precursor contendo um inibidor de formação de cristal (ver, por exemplo, o WO 98/16209; Exemplo 1) com um ACP que não contém um inibidor de formação de cristal (por exemplo, um promotor). Os reagentes podem ser misturados em um estado seco, com o tamanho de particulado apropriado e um excesso do ACP contendo o inibidor. Os reagentes podem então ser hidratados por adição de água, seguida por uma elevação na temperatura (por exemplo, como ocorre seguindo a introdução no corpo), para converter os reagentes no material PCA. Os outros métodos de conversão controlada envolvem o uso de catalisadores.

Hidroxiapatita Cristalina

Em uma segunda modalidade, o material de fosfato de cálcio é a hidroxiapatita (HA) cristalina. A HA cristalina é descrita, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs Re. 33.221 e Re. 33.161 para Brown e Chow, ambas as quais são aqui incorporadas por referência. As patentes de Brown e Chow ensinam a preparação de composições de remineralização de fosfato de cálcio e de material veículo de hidroxiapatita gradualmente reabsorvível, não-cerâmico, finamente cristalino, com base na mesma composição de fosfato de cálcio. Um sistema similar de fosfato de cálcio, que consiste em fosfato de tetracálcio (TTCP) e fosfato de monocálcio (MCP) ou sua forma de monohidrato (MCPM), é descrito por Constantz et al., nas Patentes U.S. Nºs 5.053.212 e 5.129.905, ambas as quais são incorporadas aqui por referência. Nesta modalidade, o material de fosfato de cálcio é produzido por reação ácido-base em estado sólido de reagentes de fosfato de cálcio cristalinos para formar os sólidos de hidroxiapatita.

Os materiais de HA cristalina (comumente referidos como dahli-ta) podem ser preparados de modo tal que eles sejam escoáveis, moldáveis, e capazes de endurecimento in situ (ver a Patente U.S. Nº 5.962.028 para Constantz). Estes materiais de HA (comumente referidos como hidroxiapatita carbonada) podem ser formados combinando-se os reagentes úmidos e secos para proporcionar uma mistura substancialmente uniforme, moldando-se a mistura conforme apropriado, e deixando-se a mistura endurecer. Alternativa-

tivamente, as misturas de reação precursoras podem ser administradas ao local cirúrgico e endurecidas e/ou moldadas no local. Durante o endurecimento, a mistura cristaliza-se em uma estrutura apatítica sólida e essencialmente monolítica.

5 Os reagentes geralmente consistirão em uma fonte de ácido fosfórico substancialmente isenta de água não-ligada, uma fonte de metal alcalino-terroso, particularmente o cálcio, núcleos opcionalmente cristalinos, particularmente os cristais de hidroxiapatita ou fosfato de cálcio, carbonato de cálcio, e um lubrificante fisiologicamente aceitável, tal como a água, que
10 pode ter diversos solutos. Os ingredientes secos podem ser pré-preparados como uma mistura e subsequente combinados com os ingredientes líquidos, sob condições onde ocorra uma mistura substancialmente uniforme.

A fonte de ácido fosfórico pode ser qualquer ácido fosfórico parcialmente neutralizado, particularmente até e incluindo a neutralização completa do primeiro próton como no fosfato de cálcio monobásico. Alternativa
15 ou adicionalmente, ela pode consistir em ácido ortofosfórico, possivelmente em uma forma cristalina, que esteja substancialmente isento de água não-combinada. As fontes de cálcio geralmente incluirão os contra-íons, tais como o carbonato, o fosfato ou similares, particularmente as fontes duplas
20 de fosfato de cálcio e fosfato, tais como o fosfato de tetracálcio ou o fosfato de tricálcio.

Os diversos componentes secos podem ser combinados antes da adição dos componentes úmidos. A mistura combina os ingredientes e
25 pode ser usada para regular o grau das reações entre os ingredientes. Quaisquer ou todos os ingredientes secos podem ser adicionados antes da iniciação da mistura ou antes do término da mistura mecânica. Após misturar, a mistura é deixada recozer, ao mesmo tempo permanecendo quiescente, seguido por um período de tempo prolongado, durante o qual a mistura
30 endurece.

O Agente Efervescente

A presente invenção proporciona um novo processo para produ-

zir uma matriz de fosfato de cálcio ou material de base, o qual "se autogra-
nula" e se dispersa em macrogrânulos ou macropartículas endurecidas, sob
condições fisiológicas (isto é, após a administração). O material de fosfato
de cálcio pode ser qualquer material de fosfato de cálcio biocompatível, co-
nhecido na técnica, tal como os materiais de fosfato de cálcio PCA e hidroxi-
apatita cristalina descritos acima. Surpreendentemente, os presentes inven-
tores descobriram que a adição de um agente efervescente a estes materiais
de fosfato de cálcio altera substancialmente as propriedades biológicas,
químicas e mecânicas do material, desse modo aumentando significativa-
mente a sua utilidade terapêutica. O agente efervescente da presente inven-
ção pode ser qualquer substância farmacêuticamente aceitável que produza
borbulhamento ou liberação de um gás nas temperaturas e/ou nas pressões
fisiológicas.

Todos os métodos atualmente disponíveis para produzir materi-
ais de fosfato de cálcio para uso com composições semeadas sofrem de
certas desvantagens inerentes, incluindo a capacidade limitada de injetar
devido à formação de grânulos durante a produção ou a preparação para a
administração na seringa. Os grânulos de fosfato de cálcio pré-fabricados,
aos quais a substância bioativa se adere, devem ser grandes (idealmente
100-1000 μm) para evitar fazer surgir respostas inflamatórias. Entretanto,
tais grânulos grandes pré-fabricados não são facilmente injetáveis através
das pequenas agulhas de calibração requeridas para a injeção percutânea.
Além disso, estes grânulos são tipicamente difíceis de manusear e aplicar, e
muitos são produzidos por um processo de sinterização, tornando-os essen-
cialmente não-reabsorvíveis. Além disso, o agente ativo pode somente ser
misturado com grânulos pré-formados, resultando no revestimento da super-
fície, em vez de ser uniformemente incluído ou dispersado por todo o mate-
rial. A dispersão permite uma liberação mais controlada das biomoléculas à
medida que a matriz é reabsorvida.

Em um aspecto importante da invenção, a facilidade de uso do
material biocerâmico da invenção em um endurecimento cirúrgico é signifi-
cativamente aperfeiçoada sobre os outros materiais compósitos substitutos

dos ossos conhecidos na técnica. Especificamente, um agente efervescente é adicionado aos outros componentes da composição (por exemplo, o material de fosfato de cálcio e quaisquer materiais suplementares) para fazer com que o gás espume ou borbulhe sob condições específicas (isto é, temperaturas e/ou pressões fisiológicas). O borbulhamento ou a efervescência induz a granulação e a dispersão do material de fosfato de cálcio com a injeção ou a implantação in vivo. À medida que a reação de endurecimento e/ou do cimento processa-se, a granulação ocorre simultaneamente e o agente ativo (que pode ser misturado com os outros componentes ou adicionado à mistura exatamente antes da administração) é homogeneamente dispersado por todo o volume dos grânulos individuais.

O agente efervescente é adicionado em uma quantidade apropriada para impedir a formação de uma massa de fosfato de cálcio monolítica. O agente efervescente reage rápida e completamente com uma ampla variedade de fosfatos de cálcio e outros materiais contendo cálcio ou fósforo, para proporcionar um veículo de distribuição injetável homogêneo. Dependendo do material de fosfato de cálcio particular, o agente efervescente é selecionado para interferir suficientemente com o processo de endurecimento ou de cimentação para permitir a formação de grânulos relativamente uniformes, porém não na medida em que torne o cimento de fosfato de cálcio "não-reativo". A adição do agente efervescente faz com que ocorra uma granulação substancial somente após a injeção ou a implantação in vivo. Como um resultado, a granulação não ocorre durante a preparação do material de fosfato de cálcio e/ou a formulação do cimento antes da injeção ou da implantação. Os grânulos formados na presença de um agente efervescente são suficientemente grandes para impedir uma reação inflamatória (tipicamente maiores do que 30 μm), ainda pequena o suficiente para proporcionar uma razão de área de superfície para volume significativo. A grande razão de área de superfície para volume capacita a rápida reabsorção do material de fosfato de cálcio à medida que o osso novo é regenerado. A grande área de superfície também facilita a liberação do agente biologicamente ativo, ao mesmo tempo ainda mantendo o agente no local cirúrgico para a duração de

tempo apropriada, requerida para a indução do osso. Além disso, a grande razão de área de superfície para volume facilita a migração e a infiltração das células na matriz para a secreção da matriz óssea extracelular, bem como proporcionando acesso para a vascularização. Os grânulos formados in vivo, usando os métodos e as composições da presente invenção, estão na faixa de 1-2000 μm , preferivelmente na faixa de 30-1000 μm , mais preferivelmente na faixa de 30-500 μm , e mais preferivelmente ainda na faixa de 50-100 μm .

Em uma modalidade, o agente efervescente é um gás que está dissolvido no material de fosfato de cálcio hidratado. O gás pode ser dissolvido no material sob pressão, isto é, sujeitando o material compósito a uma atmosfera pressurizada do gás, porém que é inerte para a reação de cimentação. O gás é então liberado com a exposição às temperaturas fisiológicas (isto é, com a injeção ou a implantação), devido à diminuição na solubilidade do gás com a temperatura aumentada. Sob estas circunstâncias, a dissolução do gás e a granulação subsequente ocorre somente durante o endurecimento in vivo, e não antes da administração. Isto é especificamente atrativo, visto que a granulação não é desejada ocorrer na temperatura ambiente na seringa. Como forma de exemplo somente, os gases adequados incluem o dióxido de carbono, o ar, o nitrogênio, o hélio, o oxigênio e o argônio.

Em uma outra modalidade, o agente efervescente é um líquido volátil, o qual vaporiza nas temperaturas fisiológicas.

Em mais outra modalidade, o agente efervescente é um material sólido que libera gás com a dissolução. Por exemplo, o bicarbonato de sódio emite o gás dióxido de carbono à medida que ele se converte em um intermediário de ácido carbônico instável, o qual subsequente emite dióxido de carbono e água.

Agentes Biologicamente Ativos

Qualquer agente biologicamente útil que facilite ou estimule o crescimento de osso novo pode ser distribuído a partir do material de fosfato de cálcio da invenção. De interesse particular são os materiais osteoinduti-

vos, tais como as proteínas morfogenéticas ósseas (por exemplo, a BMP-2 humana recombinante), a matriz óssea desmineralizada, os fatores de crescimento de transformação (por exemplo, o TGF- β), e as diversas outras espécies orgânicas conhecidas induzir a formação de osso. Alternativamente
 5 ou além disso, a fim de otimizar a ossificação, o veículo de distribuição pode ser semeado com as células formadoras de ossos.

Proteínas Osteoindutivas

O agente biologicamente ativo é preferivelmente selecionado a partir da família de proteínas conhecidas como a superfamília de proteínas
 10 de fatores de crescimento de transformação beta (TGF- β), que inclui as ativinas, as inibinas e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Mais preferivelmente, o agente ativo inclui pelo menos uma proteína selecionada da subclasse de proteínas conhecidas, de um modo geral, como BMPs, que têm sido descritas ter atividade osteogênica, e outras atividades do tipo
 15 crescimento e diferenciação. Estas BMPs incluem as proteínas BMP BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 e BMP-7, descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 5.108.922; 5.013.649; 5.116.738; 5.106.748; 5.187.076; e 5.141.905; BMP-8, descrita na publicação PCT WO91/18098; e BMP-9 descrita na publicação PCT WO93/00432, BMP-10 descrita no pedido PCT
 20 WO94/26893; BMP-11 descrita no pedido PCT WO94/26892, ou BMP-12 ou BMP-13 divulgadas no pedido PCT WO 95/16035; BMP-15, descrita na Patente U.S. 5.635.372; ou BMP-16 descrita na Patente U.S. 5.965.403. As outras proteínas de TGF- β que podem ser úteis como o agente ativo na presente invenção incluem a Vgr-2, Jones et al., *Mol. Endocrinol.* **6**:1961-1968
 25 (1992), e quaisquer dos fatores de crescimento e diferenciação [GDFs], incluindo aqueles descritos nos pedidos PCT WO94/15965; WO94/15949; WO95/01801; WO95/01802; WO94/21681; WO94/15966; WO95/10539; WO96/01845; WO96/02559 e outros. Também úteis na presente invenção podem ser a BIP, descrita no WO94/01557; a HP00269, descrita na Publicação JP número: 7-250688; e a MP52 descrita no pedido PCT WO93/16099.
 30 As descrições de todos os pedidos acima são, pelo presente, incorporadas por referência. Um subgrupo de BMPs que são atualmente preferidas para

uso na presente invenção inclui a BMP-2, a BMP-4, a BMP-5, a BMP-6, a BMP-7, a BMP-10, a BMP-12 e a BMP-13. O agente ativo é mais preferivelmente a BMP-2, cuja seqüência é descrita na Patente U.S. 5.013.649, cuja descrição é, pelo presente, incorporada por referência. As outras BMPs e

5 proteínas de TGF- β conhecidas na técnica podem também ser usadas.

O agente ativo pode ser produzido de modo recombinante ou purificado a partir de uma composição protéica. O agente ativo, se um TGF- β tal como uma BMP, ou outra proteína dimérica, pode ser homodimérico, ou pode ser heterodimérico com outras BMPs (por exemplo, um heterodímero

10 composto de um monômero cada de BMP-2 e BMP-6) ou com outros membros da superfamília de TGF- β , tais como as activinas, as inibinas e o TGF- β 1 (por exemplo, um heterodímero composto de um monômero cada de uma BMP e um membro relacionado da superfamília de TGF- β). Os exemplos de tais proteínas heterodiméricas são descritos, por exemplo, no Pedido de

15 Patente PCT Publicado WO 93/09229, cujo relatório descritivo é, pelo presente, incorporado aqui por referência.

O agente ativo pode adicionalmente compreender agentes adicionais, tais como as proteínas *Hedgehog*, *Frazzled*, *Chordin*, *Noggin*, *Cerberus* e *Follistatin*. Estas famílias de proteínas são, de um modo geral, descritas em Sasai et al., *Cell* **79**:779-790 (1994) (Chordin); Pedido de Patente PCT

20 WO94/05800 (Noggin); e Fukui et al., *Devel. Biol.* **159**:131-139 (1993) (Follistatin). As proteínas *Hedgehog* são descritas em WO96/16668; WO96/17924; e WO95/18856. A família de proteínas *Frazzled* é uma família de proteínas recentemente descoberta com alta homologia ao domínio para a ligação extracelular da família de proteína receptora conhecida como *Frizzled*. A família *Frizzled* de genes e proteínas é descrita em Wang et al., *J. Biol. Chem.* **271**:4468-4476 (1996). O agente ativo pode também incluir outros receptores solúveis, tais como os receptores solúveis truncados descritos na publicação de patente PCT WO95/07982. A partir do ensinamento de WO95/07982,

25 aquele versado na técnica reconhecerá que os receptores solúveis truncados podem ser preparados para diversas outras proteínas receptoras. Tal estaria também incluído na presente invenção. As publicações acima menci-

30

onadas são, pelo presente, incorporadas por referência aqui.

A quantidade de agente ativo útil aqui é aquela quantidade eficaz para estimular a atividade osteogênica aumentada das células progenitoras presentes ou de infiltração, ou de outras células, e dependerá do tamanho e da natureza do defeito que está sendo tratado, bem como do veículo que está sendo empregado. Geralmente, a quantidade de proteína a ser distribuída está em uma faixa de cerca de 0,1 a cerca de 100 mg; preferivelmente cerca de 1 a cerca de 100 mg; mais preferivelmente cerca de 10 a cerca de 80 mg.

10 *Células Formadoras de Ossos*

Em uma modalidade, a fim de otimizar a ossificação, a composição de fosfato de cálcio pode ser semeada com células formadoras de ossos, tais como as células progenitoras, as célulastronco e/ou os osteoblastos. Isto é mais facilmente efetuado colocando a composição de fosfato de cálcio em contato com uma fonte de células formadoras de ossos próprias do paciente. Tais células podem ser encontradas no tecido associado ao osso, no sangue ou nos fluidos, incluindo os fluidos exógenos que tenham estado em contato com o osso ou os materiais ou as regiões do osso, incluindo o perióstio, o osso esponjoso ou a medula. Quando usada em conjunção com dispositivos, tais como parafusos e pinos, cuja introdução no osso é acompanhada por ruptura do perióstio e/ou sangramento, nenhuma semeadura adicional é requerida. Para as placas, que se opõem somente ao osso cortical, é recomendada uma indução de uma lesão periosteal que contatará o dispositivo. Em mais outras modalidades, será útil preparar cirurgicamente um assento dentro do osso por remoção de uma porção do osso cortical no local do implante. As células formadoras de ossos coletadas do paciente podem ser introduzidas no enxerto para aumentar a ossificação. O uso de células ósseas não-autólogas está também dentro do escopo da invenção, se a quantidade desejada de regeneração óssea ocorrer antes da rejeição das células formadoras de ossos pelo hospedeiro. Assim, as células ou os tecidos obtidos de fontes primárias, linhagens de células ou bancos de células podem todos ser úteis em certas modalidades. Ver a Patente U.S. Nº

6.132.463 para Lee et al., que é incorporada aqui por referência.

Material Suplementar

O material compósito da presente invenção pode ser preparado por combinação do material de fosfato de cálcio, agente efervescente e agente biologicamente ativo com um material suplementar selecionado. O fosfato de cálcio pode servir como o material de reforço, a matriz ou ambos. O material de fosfato de cálcio em sua forma hidratada inicial tipicamente mantém um pH de cerca de 6-7 e é, portanto, compatível com uma ampla faixa de aditivos sem efeito deletério. O material suplementar é selecionado com base em sua compatibilidade com o fosfato de cálcio e os outros componentes e sua capacidade de conferir propriedades (biológicas, químicas ou mecânicas) ao compósito, as quais são desejáveis para um propósito terapêutico particular. Por exemplo, o material suplementar pode ser selecionado para aperfeiçoar a resistência à tração e à dureza, aumentar a resistência à fratura, proporcionar capacidade de formação de imagem e/ou alterar as propriedades de escoamento e os tempos de endurecimento do material de fosfato de cálcio.

O material suplementar pode ser adicionado à composição de fosfato de cálcio em quantidades variadas e em uma variedade de formas físicas, dependentes do uso terapêutico antecipado. Por exemplo, o material suplementar pode estar na forma de estruturas sólidas, tais como esponjas, malhas, filmes, fibras, géis, filamentos ou partículas, incluindo as micro- e as nanopartículas. O material suplementar, ele próprio, pode ser um compósito. O material suplementar pode ser um aditivo particulado ou líquido ou agente lubrificante, o qual é intimamente misturado com o fosfato de cálcio reabsorvível. Quando misturado intimamente com um material de fosfato de cálcio PCA, o material suplementar pode interferir em um nível macroscópico com a reação de cimentação. Isto pode ocorrer com o material suplementar revestindo uma porcentagem das partículas de cimento, permitindo que uma fraca reação de cimentação ocorra com as partículas revestidas. Alternativamente, o líquido ou o sólido pode causar a separação física entre a espécie reativa, resultando em áreas focais de formação de cimento (ou grânulos).

los). O material suplementar pode servir como uma matriz para o fosfato de cálcio, o qual está incluído ou dispersado dentro da matriz. Alternativamente, o fosfato de cálcio pode servir como uma matriz para o material suplementar, o qual está disperso na mesma. O material suplementar pode ser aplicado
 5 como um revestimento sobre uma massa de fosfato de cálcio, por exemplo, como um revestimento de pós-fabricação para retardar o tempo de reabsorção ou de outro modo afetar as propriedades do material biocerâmico. Finalmente, o material suplementar pode ser revestido com a composição de fosfato de cálcio.

10 Os materiais suplementares são desejavelmente biocompatíveis, ou seja, não há nenhuma reação prejudicial induzida pelo material quando introduzido no hospedeiro. Em muitos casos, é desejável que o material suplementar também seja biorreabsorvível. O material suplementar pode ter uma afinidade por cálcio, fosfato ou fosfatos de cálcio, o que aumentará a
 15 resistência da interface fosfato de cálcio/material suplementar. A afinidade pode ser específica ou mediada através de interações iônicas não-específicas. Como forma de exemplo somente, os polímeros biodesgastáveis adequados, para uso como uma matriz no compósito incluem, porém não estão limitados a, colágeno, glicogênio, quitina, celulosas, amido, ceratí-
 20 nas, seda, ácidos nucleicos, matriz óssea desmineralizada, ácido hialurônico derivado, polianidridos, poliortoésteres, ácido poliglicólico, ácido polilático, e seus copolímeros. Em particular, os poliésteres de ácidos α -hidroxicarboxílicos, tais como poli(L-lactídeo) (PLLA), poli(D,L-lactídeo) (PDLLA), poliglicolídeo (PGA), poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), poli(D,L-lactídeo-co-carbonato de trimetileno), e poliidroxitirato (PHB), e polianidridos, tais
 25 como o poli (anidrido-co-imida) e os seus copolímeros são conhecidos biodesgastar e são adequados para uso na presente invenção. Além disso, as composições de vidro bioativas, tais como as composições incluindo SiO_2 , Na_2O , CaO , P_2O_5 , Al_2O_3 e/ou CaF_2 , podem ser usadas em combinação com
 30 a composição de fosfato de cálcio da invenção. Os outros polímeros biodesgastáveis úteis podem incluir os polissacarídeos, os peptídeos e os ácidos graxos.

Os polímeros biodesgastáveis são vantajosamente usados na preparação de dispositivos biorreabsorvíveis, tais como, porém não limitados aos, pregos intermedulares, pinos, parafusos, placas e âncoras para a implantação em um local do osso. A fibra biorreabsorvível pode estar na forma de fios, que interagem com os fosfatos de cálcio de acordo com os princípios de projeto e fabricação de compósitos conhecidos na técnica. Tais dispositivos podem ser formados comprimindo uma mistura particulada em pó do fosfato de cálcio e polímero. Alternativamente, a matriz de fosfato de cálcio pode ser reforçada com fibras de PLLA, usando fibras de PLLA similares àquelas descritas por Tormala et al., que é incorporada aqui por referência, para a fabricação de compósitos auto-reforçadores biodegradáveis (*Clin. Mater.* **10**:29-34 (1992)).

Os polímeros biorreabsorvíveis podem ser usados também na preparação de colas ou massas de ossos para uso em situações de suporte de cargas. Os materiais suplementares podem ser adicionados ao compósito para aumentar a compressibilidade e as propriedades de suporte de cargas da cola de osso. Em particular, as fibras de carbono ou outras fibras de reforço podem ser adicionadas ao compósito. Na produção das colas substitutas de ossos reforçados com fibras, pode ser vantajoso atacar com plasma as fibras para aperfeiçoar a qualidade e a resistência da interface fosfato de cálcio/fibra. O fosfato de cálcio pode também ser endurecido a 37° C, pulverizado ou de outro modo fragmentado, e misturado com aglutinantes conhecidos, tais como os cimentos de colas de ossos, as cargas, os gessos, os epóxis, outros fosfatos de cálcio, ou géis, tais como, porém não limitados ao, sulfato de cálcio, alginato, colágeno ou produtos comercialmente disponíveis, tais como Endobone (Merck), Hapset (Lifecore Biomedical), SRS® (Norian), Bonesource® (Leibinger), Collograft® (Zimmer), Osteograft® (CereMed), e Simplex® (Howmedica). Para aplicações onde o fosfato de cálcio endurecido estiver disperso dentro da substância aglutinante, mais freqüentemente o aglutinante será preparado por métodos conhecidos para a técnica e misturado com o fosfato de cálcio particulado em volumes aproximadamente iguais, embora as proporções reais sejam variadas nas maneiras conhecidas

para a técnica, para produzir composições de consistência, trabalhabilidade e aderência desejadas.

Em mais uma outra modalidade, as suturas trançadas, tipicamente preparadas a partir de poliéster, podem ser revestidas com a composição de fosfato de cálcio da invenção, para aperfeiçoar a sua biocompatibilidade. As suturas revestidas podem ser preparadas por imersão da sutura em uma pasta fluida contendo o material de fosfato de cálcio. A afinidade da sutura pelo revestimento de fosfato de cálcio pode ser aperfeiçoada por tratamento da superfície da sutura, da partícula de fosfato de cálcio ou de ambos. Os tratamentos de superfície incluem o ataque com plasma e/ou o enxerto químico.

Em outras modalidades, um compósito é proporcionado compreendendo o material de fosfato de cálcio e um material não-reabsorvível ou pobremente reabsorvível. Os materiais não-desgastáveis ou fracamente desgastáveis adequadas incluem os dextranos, o polietileno, o polimetilmetacrilato (PMMA), as fibras de carbono, o álcool polivinílico (PVA), o poli(tereftalato de etileno)poliamida, os biovidros, e aqueles compostos listados anteriormente para uso em colas ou massas de ossos.

Um outro uso é permanentemente incluir objetos úteis, tais como um pino ou malha de reforço, no osso propriamente dito. O objeto serve como uma âncora para a ligação estável ao osso natural. Isto é particularmente útil na ligação de ligamentos e tendões ao osso. Os objetos compreendendo o fosfato de cálcio biorreabsorvível e de ossificação e um dispositivo não-reabsorvível adequado podem ser colocados em um osso e adicionalmente prendidos com material de fosfato de cálcio ou material compósito adicional em uma formulação de cola de osso. O dispositivo então se torna incluído no osso seguindo a ossificação novamente do material de fosfato de cálcio.

Em mais uma outra modalidade da invenção, uma composição é preparada por combinação do fosfato de cálcio ou material compósito com um aditivo, o qual altera as propriedades de reabsorção, o tempo de endurecimento e/ou as características de escoamento do compósito. Por exemplo,

- o óleo de silicone ou outros polímeros ou líquidos lubrificantes podem ser adicionados ao compósito para aperfeiçoar as características de escoamento do compósito para a distribuição para o hospedeiro por seringa. O lubrificante é preferivelmente biocompatível e capaz de rápida lixiviação a partir do compósito de material substituto do osso seguindo a solidificação da composição de fosfato de cálcio in vivo. Os lubrificantes adequados incluem, como forma de exemplo somente, as ceras de polímeros, os lipídeos e os ácidos graxos. Os lubrificantes podem ser usados em uma concentração de cerca de 0,1 a cerca de 30% em peso.
- Os exemplos que se seguem detalham as modalidades presentemente preferidas da invenção. Diversas modificações e variações na sua prática são esperadas ocorrer para aqueles versados na técnica com a consideração destas descrições. Estas modificações e variações são acreditadas estar incluídas nas reivindicações anexadas ao mesmo. Estes exemplos não limitam, de modo algum, a invenção.

Os conteúdos inteiros de todas as referências, patentes e pedidos de patentes publicados, citados por todo este pedido, são incorporados aqui por referência.

EXEMPLOS

- Todos os componentes utilizados nestes exemplos são grau farmacêutico. O componente de fosfato de cálcio era o material substituto de osso comercialmente disponível, vendido sob o nome comercial CEREDEX[®] pela Etex Corporation, 38 Sydney Street, Cambridge, MA 02139. O agente biologicamente ativo utilizado era a proteína morfogenética óssea 2 humana recombinante (rhBMP-2). A produção e a caracterização da BMP-2 são descritas em detalhe na Patente U.S. Nº 5.013.649.

Exemplo 1: Preparação da Composição de Fosfato de Cálcio

- Uma pasta apatítica de fosfato de cálcio amorfa, pobremente cristalina, foi preparada conforme descrito na Patente U.S. Nº 5.650.176, exceto que 20% em peso de bicarbonato de sódio foram adicionados ao precursor em pó de fosfato de cálcio amorfo (ACP). O ACP foi então hidratado com uma quantidade limitada de água para formar uma pasta, a qual

permaneceu trabalhável na temperatura ambiente por 20-30 minutos.

Exemplo 2: Análise do Implante In vitro

Uma composição de fosfato de cálcio foi preparada conforme descrito no Exemplo 1. A pasta hidratada foi então injetada em um banho de solução salina na temperatura do corpo. O material de fosfato de cálcio endureceu em macrogrânulos sob as condições in vivo simuladas (isto é, 37 °C).

Exemplo 3: Injeção Intramuscular

Uma primeira composição de fosfato de cálcio contendo 20% em peso de bicarbonato de sódio foi preparada conforme descrito no Exemplo 1. Uma segunda pasta de fosfato de cálcio foi preparada conforme descrito na Patente U.S. Nº 5.650.176, exceto que 29% em peso de polietileno glicol foram adicionados ao precursor em pó de fosfato de cálcio amorfo (ACP). As duas composições de ACP foram então hidratadas com uma quantidade limitada de água, para formar duas pastas, ambas as quais formaram macrogrânulos de aproximadamente 100-1000 micra com a explantação de diversas horas após a injeção. Além disso (dados não-mostrados), a granulação ocorreu após a injeção de 20 µg de rhBMP-2, distribuída no cimento de endurecimento monolítico de fosfato de cálcio ou na composição de fosfato de cálcio de autogranulação. A quantidade de osso induzido em 21 dias usando a rhBMP-2 distribuída na composição (fosfato de cálcio) macrogranular era significativamente maior do que o material de controle (cimento monolítico); dados não-mostrados. Além disso, a retenção local de rhBMP-2 distribuída usando os materiais de fosfato de cálcio macrogranulares era significativamente menor do que o material de controle (isto é, aproximadamente 30 % versus 75 %; dados não-mostrados). A composição macrogranular da invenção proporciona uma liberação mais rápida da proteína osteoindutiva devido à área de superfície aumentada disponível para a reabsorção da matriz pelos osteoclastos. Esta reabsorção da matriz, por sua vez, libera a rhBMP-2 solúvel do material de fosfato de cálcio.

Exemplo 4: Injeção em Osteotomia Intrafibular

Uma composição de fosfato de cálcio contendo 20 % em peso

de bicarbonato de sódio foi preparada conforme descrito no Exemplo 1. 20 µg de rhBMP-2 foram adicionados à composição de ACP resultante, que foi então hidratada com uma quantidade limitada de água para formar uma pasta. 0,5 cm³ do material hidratado foi injetado em uma osteotomia fibular de primata não-humano. A granulação e a dispersão dos macrogrânulos eram evidentes após um dia. Em contraste, em uma semana após a injeção, o material de fosfato de cálcio padrão, sem bicarbonato de sódio (controle), permaneceu em uma massa monolítica sólida (dados não-mostrados).

Exemplo 5: Osteotomia da Fíbula de Primata Não-Humano

Uma composição de fosfato de cálcio contendo 20 % em peso de bicarbonato de sódio (rhBMP-2/NaBSM20) foi preparada conforme descrito no Exemplo 4. O objetivo deste estudo foi determinar a eficácia de uma única injeção percutânea de rhBMP-2/NaBSM20 administrada 7 dias após cirurgia para acelerar a cicatrização da osteotomia da fíbula em macacos cynomolgus machos adultos. Estes resultados foram comparados com um estudo anterior onde a injeção foi feita 3 horas após a cirurgia (dados não-mostrados). As osteotomias das fíbulas bilaterais, estabilizadas com um pequeno pino intramedular, foram criadas em 12 animais. Uma osteotomia em seis animais foi injetada com 0,5 ml de 1,5 mg/ml de rhBMP-2 por ml de NaBSM20 sete dias após criar a osteotomia. A osteotomia da fíbula contralateral foi deixada não-tratada como um controle cirúrgico. Uma osteotomia nos seis animais restantes foi injetada com tampão/NaBSM20 sem rhBMP-2 para servir como um controle de veículo. A osteotomia contralateral novamente serviu como um controle cirúrgico não-tratado.

Radiografias em série tiradas em intervalos semanais após a cirurgia revelaram uma formação de osso mineralizado nas osteotomias tratadas com rhBMP-2/NaBSM tão logo quanto 1 semana após a injeção. Em duas semanas após a injeção houve uma formação de osso novo considerável, visível de modo radiográfico. O calo de ponte de osso novo através da osteotomia estava presente tão logo quanto 3-5 semanas após o tratamento (4-6 semanas após a osteotomia). As osteotomias foram cicatrizadas de modo radiográfico em 7 semanas após o tratamento (8 semanas após a os-

teotomia). Não havia nenhuma evidência de material veículo de NaBSM residual neste ponto de tempo. A evidência de formação de osso novo nos controles contralaterais não surgiu até aproximadamente 3-4 semanas após a injeção (4-5 semanas após a osteotomia). Não havia nenhuma evidência radiográfica de calo de ponte ou de cicatrização da osteotomia em 7 semanas após o tratamento (8 semanas após a osteotomia) nos controles contralaterais cirúrgicos a partir do grupo de tratamento com rhBMP-2/NaBSM. O aspecto radiográfico dos controles tratados com tampão/NaBSM e cirúrgicos contralaterais no segundo grupo de animais era similar aos controles cirúrgicos contralaterais no grupo tratado com rhBMP-2/NaBSM. Havia ainda evidência de veículo residual nas osteotomias tratadas com tampão/NaBSM em 7 semanas após a injeção (8 semanas após a osteotomia).

A deformação de torção mecânica das osteotomias tratadas com rhBMP-2/NaBSM20 em 8 semanas após a osteotomia era significativamente maior do que a resistência e a rigidez do osso normal ($1,58 \pm 0,40$ vs $1,24 \pm 0,26$ Nm). A deformação de torção era também significativamente maior neste grupo comparada aos controles cirúrgicos contralaterais ($0,72 \pm 0,19$ Nm) e às osteotomias tratadas com tampão/Na/BSM20 e cirúrgicas contralaterais deste grupo ($0,87 \pm 0,29$ e $0,74 \pm 0,21$ Nm). Não havia nenhuma diferença significativa entre a deformação de torção mecânica nas osteotomias com tampão/NaBSM20 comparadas às osteotomias de controle cirúrgico contralaterais dos mesmos animais e comparadas aos controles cirúrgicos dos animais com rhBMP-2/NaBSM. As osteotomias de controle cirúrgico não-tratadas assemelham-se à resistência mecânica do osso normal após cerca de 14 - 16 semanas. Foram observados resultados similares para a rigidez da osteotomia.

Este estudo demonstra uma aceleração maior do que 50% da cicatrização da osteotomia em resposta à injeção de rhBMP-2/NaBSM20 sete dias após criar a osteotomia. O surgimento da formação de osso novo foi muito mais cedo do que foi observado nas osteotomias com rhBMP-2/NaBSM e rhBMP-2/aBSM tratadas 3 horas e 1 dia após a osteotomia em estudos anteriores. A deformação de torção mecânica era também maior

- nos animais tratados 7 dias após a osteotomia em comparação com o tratamento por 3 h e 1 dia. A aceleração da cicatrização da osteotomia foi em torno de 30-40% quando o tratamento foi administrado nestes dois pontos de tempo. Os resultados preliminares indicam que a cicatrização da osteotomia
- 5 acelerada pode também ser obtida com o tratamento administrado 2 semanas após a criação da osteotomia. Estes resultados destes estudos indicam que a combinação de rhBMP-2/NaBSM acelera significativamente a cicatrização da osteotomia quando administrada entre 3 horas e 7 dias após a criação da osteotomia.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para o tratamento de um mamífero tendo um defeito no osso, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína osteogênica como um agente biologicamente ativo, um material de fosfato de cálcio como um veículo, e um agente efervescente, em que a composição
5 forma grânulos quando exposta às condições fisiológicas.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína osteogênica é selecionada a partir do grupo consistindo em membros da família de proteína morfogênica óssea (BMP).
- 10 3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína osteogênica é selecionada a partir do grupo consistindo em BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-10, BMP-12, BMP-13 e MP52.
- 15 4. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína osteogênica é a BMP-2.
5. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína osteogênica é a BMP-6.
- 20 6. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína osteogênica é a BMP-12.
7. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína osteogênica é a BMP-13.
8. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a proteína osteogênica é a MP52.
- 25 9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o material de fosfato de cálcio é selecionado a partir do grupo consistindo em fosfato de cálcio apatítico amorfo, hidroxiapatita, fosfato tricálcico e fluorapatita.
- 30 10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o material de fosfato de cálcio é um fosfato de cálcio apatítico amorfo.
11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o material de fosfato de cálcio é

um fosfato de cálcio apatítico fracamente cristalino.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o fosfato de cálcio apatítico fracamente cristalino tem uma razão de cálcio para fosfato comparável aos minerais dos ossos de ocorrência natural.

13. Composição de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizada pelo fato de que o fosfato de cálcio apatítico fracamente cristalino tem uma razão de cálcio para fosfato de menos do que 1:1,50.

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, caracterizada pelo fato de que o fosfato de cálcio apatítico fracamente cristalino tem uma razão de cálcio para fosfato de 1:1,40.

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada pelo fato de que o agente efervescente é o bicarbonato de sódio.

16. Composição de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o bicarbonato de sódio está presente em uma concentração entre 10 a 40 por cento (p/p).

17. Uso de uma quantidade eficaz de uma composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para o tratamento de um mamífero tendo um defeito no osso.

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO VEÍCULOS DE DISTRIBUIÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO PARA PROTEÍNAS OSTEOINDUTIVAS, E RESPECTIVO USO**".

- 5 A presente invenção refere-se a uma composição para o tratamento de um mamífero tendo um defeito no osso. A composição compreende uma proteína osteogênica, um material de fosfato de cálcio como um veículo, e uma quantidade eficaz de um agente efervescente. Os métodos de preparar as composições e os métodos de usar as composições osteogênicas
- 10 cas para tratar osso osteoporótico e/ou osteopênico são também descritos.