



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 183**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97911717 .3**

86 Fecha de presentación : **16.10.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0941079**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.1999**

54 Título: **Composiciones biocerámicas.**

30 Prioridad: **16.10.1996 US 729354**
16.10.1996 US 729342

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **ETEX CORPORATION**
38 Sydney Street
Cambridge, Massachusetts 02138, US

72 Inventor/es: **Lee, Dosuk, D.;**
Rey, Christian;
Aiolova, Maria y
Tofighi, Aliassghar

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 299 183 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

Composiciones biocerámicas.

5 **Antecedentes de la invención**

Gran parte de la investigación en el área de los productos biofarmacéuticos está dirigida hacia el desarrollo de vehículos implantables eficaces para la administración de fármacos y otras aplicaciones quirúrgicas. Tales vehículos deben ser biocompatibles y deben ser también capaces de proteger la actividad de cualquier agente biológicamente activo que estén destinados a administrar. Muchos agentes biológicamente activos son lábiles y pierden fácilmente su actividad cuando son incorporados a un material de administración. La conservación de la actividad de proteínas ha planteado problemas particularmente difíciles.

En el campo de la administración de fármacos, se han estudiado las cerámicas de fosfato de calcio como potenciales vehículos de administración debido a su bien conocida biocompatibilidad y a su afinidad por los reactivos proteicos (ver, por ejemplo, IJntema y col., Int. J. Pharm. 112:215, 1994; Itokazu y col., J. Ohn. Surg. 2:47, 1994; Shinto y col., J. Bone Joint Surg. 74-B:600, 1992; Uchida y col., J. Orth. Res. 10:440, 1992). Sin embargo, las reacciones empleadas para producir los materiales cerámicos de fosfato de calcio conocidos requieren típicamente temperaturas y/o presiones elevadas, y requieren también la presencia de ácidos o bases. Como la mayoría de los agentes biológicamente activos serán destruidos por una o más de las condiciones requeridas para producir la cerámica, los agentes biológicamente activos podrán ser cargados únicamente después de que el material haya sido producido, lo cual puede limitar la cantidad y el tipo de agente que puede ser administrado.

Además, aunque varios materiales de fosfato de calcio han sido referidos como “reabsorbibles”, tales compuestos, que normalmente contienen o derivan de fosfato tricálcico, fosfato tetracálcico o hidroxiapatita, son de hecho reabsorbibles sólo débilmente. Del grupo, los compuestos de fosfato tricálcico han demostrado ser los más reabsorbibles y, después de muchos años de estudio, no son todavía muy utilizados en el entorno clínico. Se sabe que los fosfatos tricálcicos tienen perfiles de reabsorción prolongados y en cierto modo impredecibles, requiriendo generalmente más de un año para la reabsorción. A no ser que se lleven a cabo etapas para producir fosfatos tricálcicos extremadamente porosos o acanalados, estos compuestos no son sustituidos por hueso. Estudios recientes han llevado a la conclusión de que la “biodegradación de TCP, que es mayor que la de [hidroxiapatita], no es suficiente” (Berger y col., Biomaterials 16:1241, 1995).

Los compuestos derivados del fosfato tetracálcico y de la hidroxiapatita son también solamente reabsorbibles de forma débil. Los informes publicados sobre los rellenos de fosfato tetracálcico describen generalmente una reabsorción parcial durante largos periodos de tiempo. Por ejemplo, según está descrito por Horioglu y col., es común que tales materiales requieran 30 meses para una reabsorción del 80% (Soc. for Biomaterials, pág. 198, 18-22 de Marzo de 1995). Además, muchos informes que describen la “reabsorción” de materiales de fosfato de calcio no demuestran realmente la reabsorción, ya que los autores no descartan, por ejemplo, la migración del vehículo desde el lugar del implante (ver, por ejemplo, IJntema y col., *supra*).

En el campo quirúrgico, uno de los objetivos de la cirugía reconstructora es el poder sustituir el tejido dañado por nuevo tejido, cultivado quizás a partir de las propias células del paciente. Por ejemplo, hay investigadores que han intentado desarrollar sistemas de regeneración de cartílago en los cuales condrocitos aislados son inyectados en un área lesionada en el contexto de un soporte polimérico (ver, por ejemplo, Atala y col., J. Urol. 150:747, 1993; Freed y col., J. Cell. Biochem. 51:257, 1993 y las referencias citadas en los mismos). Se han estudiado sistemas de soportes sembrados similares en el contexto de la reparación ósea, en los cuales se utilizan células osteoblásticas conjuntamente con soportes poliméricos o cerámicos (ver, por ejemplo, Elgandy y col., Biomater. 14:263, 1993; Ishaug y col., J. Biomed. Mater. Res. 28:1445, 1994). Se han estudiado también composiciones sembradas para determinar su utilidad en el control de la vejiga y en aplicaciones vesiculouretrales (ver, por ejemplo, Griffith-Cima y col., solicitud PCT publicada n° WO 94/25080).

Los investigadores de este campo han identificado varias características que son deseables para que los materiales de soporte sean utilizados en tales composiciones sembradas. Por ejemplo, Freed y col. (Bio/Technology 12:689, 1994) enumeran los seis factores siguientes como características deseables:

- (1) la superficie del soporte debe permitir la adhesión celular y el crecimiento celular;
- (2) ni el material del soporte ni sus productos de degradación deben provocar inflamación o toxicidad cuando son implantados *in vivo*;
- (3) el material del soporte debe ser procesable de manera reproducible en estructuras tridimensionales;
- (4) el material del soporte debe tener una porosidad de al menos un 90%, de tal manera que proporcione un área superficial grande para las interacciones célula-soporte, un espacio suficiente para la regeneración de la matriz extracelular y limitaciones mínimas de la difusión durante el cultivo *in vitro*;

- (5) el material del soporte debe reabsorberse una vez que ha cumplido su finalidad de proporcionar un molde para el tejido que se está regenerando; y
- (6) la velocidad de degradación del soporte debe ser ajustable para igualar la velocidad de regeneración del tejido por el tipo celular de interés.

Permanece la necesidad del desarrollo de un vehículo para la administración de fármacos que sea biocompatible, totalmente reabsorbible y que no sea nocivo para la actividad del fármaco. Existe también la necesidad de desarrollar materiales adecuados para ser utilizados como soportes en la reparación tisular. La presente invención resuelve estas necesidades proporcionando materiales y composiciones útiles para la administración de fármacos y la reparación tisular.

Definiciones

“Amorfo” -- Por “amorfo”, según se utiliza ese término en la presente, se quiere indicar un material con un carácter amorfo significativo. El carácter amorfo significativo contempla más de un 75% de contenido amorfo, preferiblemente más de un 90% de contenido amorfo, y se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X ancho, sin rasgos distintivos. Se reconoce que puede existir en el material un pequeño grado de cristalinidad. Sin embargo, para los materiales precursores amorfos de la presente invención, es preferible que el grado de cristalinidad sea inferior al deseado en el material del producto.

“Bioactivo” -- “Bioactivo” se refiere a un material que induce la formación de tejido duro en y alrededor del implante. Cuando es implantado en un tejido blando, la bioactividad puede requerir también la presencia de un factor de crecimiento o trófico, o la adición al implante de un tipo celular formador de tejido duro.

“Biocompatible” -- El término “biocompatible”, según se utiliza en la presente, indica que el material no produce una respuesta nociva sustancial en el huésped. Existe siempre la preocupación de que, cuando se introduce un objeto extraño en un ser vivo, el objeto induzca una reacción inmune, tal como una respuesta inflamatoria que tendrá efectos negativos en el huésped. Por ejemplo, aunque la hidroxiapatita es considerada generalmente “biocompatible”, se ha observado una inflamación y una necrosis tisular significativas cuando se insertan intramuscularmente microvehículos de hidroxiapatita cristalina en animales (ver, por ejemplo, IJntema y col., Int. J. Pharm. 112:215 (1994)).

“Biorreabsorbible” -- “Biorreabsorbible” se refiere a la capacidad de un material para ser reabsorbido *in vivo*. Una reabsorción “total” significa que no permanecen fragmentos extracelulares significativos. El proceso de reabsorción implica la eliminación de los materiales del implante original a través de la acción de los fluidos, enzimas o células corporales. El fosfato cálcico reabsorbido puede ser, por ejemplo, depositado de nuevo como mineral óseo, o ser reutilizado de otro modo en el organismo, o bien ser excretado. “Potentemente biorreabsorbible”, según se utiliza este término en la presente, significa que al menos un 80%, preferiblemente un 95-99% y, muy preferiblemente >99% de la masa total del material implantado intramuscularmente o subcutáneamente es reabsorbida en un año. En las realizaciones preferidas de la invención, el fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino (PCA) que se reabsorbe potentemente se caracteriza porque cuando al menos 1 g (preferiblemente 1-5 g) del material de PCA es implantado en un lugar subcutáneo o intramuscular, al menos el 80% del material es reabsorbido en un año. En realizaciones más preferidas, el material será reabsorbido en nueve meses, seis meses, tres meses e idealmente en un mes. Además, los materiales particularmente preferidos se caracterizan porque pueden ser reabsorbidos totalmente en los periodos de tiempo indicados. Para los fines de esta descripción, “débilmente” reabsorbible significa que menos del 80% del material de partida es reabsorbido después de un año.

“Cantidad eficaz” -- Una cantidad eficaz de un agente biológicamente activo es una cantidad suficiente para producir una respuesta biológica deseada.

“Endurecimiento” -- “Endurecimiento” se refiere al proceso mediante el cual el precursor hidratado es transformado en un material de PCA endurecido. Se considera que el material de PCA está “endurecido” cuando es un sólido sustancialmente no modelable. Tal material de PCA endurecido tiene una compresibilidad mínima y tiende a experimentar una deformación plástica en vez de una deformación elástica.

“Precursor hidratado” -- El término “precursor hidratado”, según se utiliza en la presente, se refiere a la pasta o masilla formada por la hidratación de los precursores de PCA secos en presencia de una cantidad limitada de una solución acuosa (esto es, menos de 1 ml de solución acuosa/1 g de polvo de precursor aproximadamente). El precursor hidratado puede contener reactivos y productos en varias combinaciones, dependiendo del grado hasta el cual haya progresado la conversión. Las pastas del precursor de PCA “inyectables” y “modelables” descritas en la presente son precursores hidratados. Los precursores hidratados “inyectables” preferidos tienen una consistencia apropiada para su administración a través de una aguja de calibre 18.

“Fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino”, “fosfato de calcio PCA” y “material de PCA”, según se utilizan esos términos en la presente, describen un fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino sintético. El material de PCA no se limita necesariamente a una única fase de fosfato de calcio siempre que tenga el patrón de DRX y FTIR característico. Un fosfato de calcio PCA tiene sustancialmente el mismo espectro de difracción de rayos X que el hueso. El espectro se caracteriza generalmente por sólo dos picos anchos en la región de 20-35°, uno centrado en 26°

y el otro centrado en 32°. Se caracteriza además por picos de FTIR en 563 cm⁻¹, 1034 cm⁻¹, 1638 cm⁻¹ y 3432 cm⁻¹ (± 2 cm⁻¹). Se observan hombros pronunciados a 603 cm⁻¹ y 875 cm⁻¹, con un doblete que tiene el máximo a 1422 cm⁻¹ y 1457 cm⁻¹.

5 “Promotor” -- El término “promotor”, según se utiliza en la presente, describe un material o tratamiento que estimula el endurecimiento de un precursor hidratado y que puede incrementar la conversión del ACP en fosfato de calcio PCA. Algunos promotores participan en la conversión y se incorporan al material de PCA del producto; otros, conocidos como promotores “pasivos”, no participan.

10 “Reactivo” -- “Reactivo” se utiliza en la presente para hacer referencia a la capacidad de un fosfato de calcio amorfo para formar un precursor hidratado cuando es mezclado con un líquido, con el fin de experimentar la conversión en el material de PCA de la presente invención en presencia de un promotor en asociación con el endurecimiento de los materiales precursores. Los ACPs preferidos se caracterizan por la capacidad de convertirse completamente, la capacidad de convertirse rápidamente con endurecimiento, la capacidad para experimentar la conversión con compuestos de otro modo inertes y/o la capacidad para convertirse en un material de PCA sustancialmente homogéneo. Cuando el ACP reacciona con un segundo fosfato de calcio, la “conversión” puede incluir la conversión del ACP y del segundo fosfato de calcio. El grado de endurecimiento y la cinética del proceso de endurecimiento son también elementos importantes de la reactividad. Algunos ACPs son más reactivos que otros. Se considera que un ACP es “altamente reactivo” si experimenta conversión y endurecimiento para dar lugar a un material de PCA en presencia de un promotor débil, tal como fosfato dicálcico dihidrato (“DCPD”) con una distribución de granos que contiene una fracción significativa de tamaños de grano mayores de 100 μ m. Los ACPs altamente reactivos preferidos producen un material de PCA endurecido en presencia del promotor débil DCPD y agua a 37°C en menos de doce horas, siendo el endurecimiento sustancialmente completo en un tiempo de una a cinco horas aproximadamente e, idealmente, en 10-30 minutos.

25 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona un material de fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino, sintético, que tiene una excelente biocompatibilidad, unas excelentes características de reabsorción y capacidad de procesamiento y que es útil en aplicaciones de administración de fármacos y de siembra celular (*in vivo* e *in vitro*).

El material de PCA sintético utilizado en la presente invención es compatible con células y con un amplio abanico de agentes biológicamente activos. El material puede ser empleado para administrar agentes o células a cualquiera de una variedad de lugares del organismo, o puede ser utilizado *in vitro*. El material se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X distintivo que revela su débil cristalinidad. Preferiblemente, el material tiene una proporción de calcio respecto a fosfato en el rango de 1,1 a 1,9 aproximadamente. Más preferiblemente, esta proporción está en el rango de 1,3 a 1,5 aproximadamente.

El material de PCA utilizado en la presente invención es potentemente biorreabsorbible. Esto es, cuando un implante que contiene al menos un 1 g de material es implantado en forma de pastilla en un lugar intramuscular o subcutáneo, al menos un 80% aproximadamente, preferiblemente un 90-95% y, muy preferiblemente, >95% del material es reabsorbido en un año, preferiblemente en 9 meses, 6 meses, 3 meses e, idealmente, en 1 mes. Más preferiblemente, al menos un 80%, preferiblemente un 90-95% y, muy preferiblemente, >95% de un implante de 5 g es reabsorbido en estos marcos de tiempo. Se apreciará que la conformación del material (por ejemplo, en una esfera en comparación con una varilla o con otra forma) puede influir sobre su velocidad de reabsorción. Además, la velocidad de reabsorción del vehículo de administración puede ser variada a través de su forma de preparación.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el material de PCA sintético es formado en una reacción en la cual al menos un precursor de fosfato de calcio amorfo (ACP) es expuesto a un promotor. En realizaciones particularmente preferidas el promotor contiene un segundo material de fosfato de calcio. Las condiciones de reacción empleadas para producir el material de PCA utilizado en la presente invención son suaves, de tal manera que agentes biológicos o células pueden ser incorporados al material durante la reacción de formación, si se desea. Alternativamente, los agentes pueden ser incorporados después de que se haya producido el vehículo de administración. El material del vehículo de administración puede ser modelado en cualquiera de una variedad de formas de administración útiles, antes o después de la introducción del agente biológicamente activo o de la célula, y puede ser administrado al lugar mediante, por ejemplo, inyección o implantación quirúrgica. El material puede ser introducido en el lugar en estado húmedo, no endurecido (esto es, como un precursor hidratado) y se deja que endurezca *in situ*. El vehículo puede ser alternativamente endurecido *in vitro* a una temperatura elevada, generalmente a o por encima de 37°C, y posteriormente implantado quirúrgicamente en un sujeto (animal o humano).

El material de PCA de la presente invención puede ser fabricado *in vitro* en presencia o ausencia del agente biológicamente activo o de la célula. Alternativamente, el agente biológicamente activo o la célula pueden ser añadidos después del endurecimiento mediante exposición del vehículo premodelado al agente.

La presente invención proporciona por tanto vehículos para la administración de agentes biológicamente activos, vehículos que contienen un fosfato de calcio PCA y un agente biológicamente activo. Los vehículos de la invención contienen opcionalmente, por ejemplo, otros materiales biorreabsorbibles, modificadores de la tasa de erosión, células u otros factores que modifican una o más características del vehículo (tales como su potencia, su adherencia, su

inyectabilidad, sus características de fricción, etc.). Una ventaja del sistema de administración de la presente invención es que permite conseguir una elevada concentración local del fármaco, lo cual es particularmente útil con fármacos que tienen efectos colaterales tóxicos y también con fármacos lábiles.

5 La invención proporciona también métodos para preparar vehículos de administración, para alterar las características de los vehículos de administración y para administrar agentes biológicamente activos a un lugar. Los lugares preferidos de administración incluyen lugares *in vitro* e *in vivo*. Los vehículos de administración de la invención son adecuados para la administración a lugares humanos o animales. Los lugares *in vivo* preferidos incluyen lugares óseos, lugares intramusculares, lugares intraperitoneales, lugares subcutáneos, lugares del sistema nervioso central y lugares
10 oculares. Los implantes pueden contener también componentes adicionales tales como agentes biológicamente activos o factores que alteren las características (tales como las características de capacidad de reabsorción, potencia, adherencia, inyectabilidad, las características de fricción, etc.).

15 La invención proporciona también métodos para preparar tales implantes; métodos para el crecimiento de hueso o cartilago *in vivo* o *in vitro* en lugares naturales o ectópicos; métodos para el aumento óseo; y se describen también métodos para el diagnóstico de estados de enfermedad mediante el análisis del potencial para formar tejidos de células aisladas de un huésped.

Descripción de las figuras

20 La Figura 1 es una micrografía electrónica de transmisión de alta resolución del fosfato de calcio amorfo reactivo que ilustra los granos del tamaño de nanómetros en grupos con límites relativamente poco claros e inmersos parcialmente en una forma sin definición (flechas).

25 La Figura 2 es un espectro de dispersión de energía en una microsonda electrónica del fosfato de calcio amorfo reactivo de la presente invención después del procedimiento de calentamiento en vacío que hizo que la proporción Ca/P fuera de 1,58.

30 La Figura 3 es una curva de solubilidad de un producto de fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino derivado del fosfato de calcio amorfo de la presente invención, en comparación con una hidroxiapatita cristalina. Observar la solubilidad relativamente más elevada del material de la presente invención frente a una forma más cristalina de hidroxiapatita, medida por la cantidad de iones de calcio liberados a la solución a 37°C.

35 La Figura 4 son patrones de difracción de rayos X de (a) fosfato de calcio amorfo reactivo y del (b) difosfato dicálcico utilizados en una reacción para formar un material sustitutivo del hueso de la invención.

Las Figuras 5a-d son patrones de difracción de rayos X que siguen el progreso de la reacción de una mezcla de fosfato de calcio amorfo reactivo y difosfato dicálcico para formar un material de PCA de la presente invención.

40 La Figura 6 es un espectro infrarrojo de (a) fosfato dicálcico dihidrato, (b) el ACP activado de la invención y (c) el material de PCA de la presente invención.

La Figura 7 es un patrón de difracción de rayos X de un hueso existente en la naturaleza.

45 La Figura 8 es una gráfica de barras que muestra la distribución del tamaño de partículas de varias formulaciones descritas en el Ejemplo 5.

La Figura 9 representa la utilización del material de PCA de la presente invención en una variedad de lugares óseos.

50 La Figura 10 presenta fotomicrografías de defectos tibiales sin tratar (10a) o tratados (10b) con el material de PCA de la presente invención. En la Figura 10a, las flechas pequeñas indican un borde del defecto; la cabeza de flecha grande está en el defecto todavía sin rellenar. En la Figura 10b, las cabezas de flechas grandes indican un borde del defecto. En ambas figuras, el aumento es de 4x, el hueso está descalcificado y los cortes están tratados con hematoxilina y eosina.
55

La Figura 11 es una fotomicrografía de hueso trabecular canino crecido en un defecto 8 semanas después de la cirugía que fue tratado con el vehículo para la administración de fármacos de la presente invención. (Aumento 10x; descalcificado; hematoxilina y eosina).
60

La Figura 12 es una fotomicrografía de un defecto óseo cortical canino 4 semanas después de la cirugía que fue tratado con el vehículo para la administración de fármacos de la presente invención. (Aumento 4x; sin descalcificar, Fucsina Básica Verde Claro).

65 La Figura 13 presenta fotomicrografías de defectos tibiales de conejo sin tratar (Figura 13a) y tratados (Figura 13b) 4 semanas después de la cirugía. (Aumento 4x; descalcificado; Tricrómico de Masson).

ES 2 299 183 T3

La Figura 14 es una fotomicrografía de una región externa a un lugar óseo en la cual ha tenido lugar la formación de cartílago (hematoxilina y eosina).

5 La Figura 15 es un patrón de difracción de rayos X del fosfato de calcio PCA preparado según está descrito en el Ejemplo 1-2.

La Figura 16 es un patrón de difracción de rayos X del fosfato de calcio PCA preparado según está descrito en el Ejemplo 1-4.

10 La Figura 17 es un patrón de difracción de rayos X del fosfato de calcio PCA preparado a partir del promotor pasivo Al_2O_3 , en el cual los picos del Al_2O_3 están indicados por líneas.

La Figura 18 muestra el análisis mediante DRX del material recuperado de conejos.

15 La Figura 19 muestra el análisis mediante FTIR del material recuperado de conejos.

La Figura 20 muestra los resultados de la formación de hueso nuevo y de la reabsorción del material de PCA.

20 Descripción de las realizaciones preferidas

El Material de PCA

25 El material de PCA de la presente invención está descrito en las solicitudes copendientes U.S.S.N. 08/650.764 y/o U.S.S.N. 08/446.182, cada una de las cuales se incorpora a la presente por referencia. El material está descrito también en un conjunto de solicitudes relacionadas tituladas "Delivery Vehicle"; "Conversion of Amorphous Calcium Phosphate to Form a Novel Bioceramic"; "Orthopedic and Dental Ceramic Implants"; y "Bioactive Ceramic Composites", cada una de las cuales es de la misma fecha que la presente y se incorpora aquí por referencia. A la luz de la amplitud de las descripciones en cada una de estas solicitudes relacionadas, los detalles de los materiales de PCA de la invención no serán abordados en la presente. Bastará con un resumen de sus características.

30 El material de PCA empleado en la presente invención se caracteriza por su biocompatibilidad, su capacidad de reabsorción biológica y su cristalinidad mínima. El material puede ser muy poroso y rápidamente reabsorbible o bien puede tener porosidad disminuida y ser reabsorbible lentamente. Su carácter cristalino es sustancialmente el mismo que el del hueso natural y carece del mayor grado de cristalinidad observado en los materiales sustitutos del hueso conocidos en la técnica. El material de PCA de la invención es también biocompatible y no es nocivo para el huésped.

40 El material de PCA de la presente invención puede ser implantado en un paciente en forma de pasta o masilla (esto es, como un precursor hidratado). Como la reacción de la invención que produce el material de PCA endurecido puede ser iniciada fuera del organismo, y procede lentamente a temperatura ambiente, se minimiza la posibilidad de que el material se "establezca" antes de la aplicación en el lugar quirúrgico y se convierta en inutilizable. La reacción se acelera significativamente a la temperatura corporal y el material se endurece en su lugar. Esta característica es particularmente útil en el entorno quirúrgico, donde se requiere típicamente el ajuste personalizado del dispositivo en el lugar del implante. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas de la invención, se administra en el lugar de una fractura un antibiótico y/o un factor regenerador. En tales realizaciones, la pasta de la invención conteniendo el agente terapéutico será aplicada a, y utilizada para rellenar, el lugar de la fractura, así como para administrar el agente deseado.

50 Alternativamente, el material de PCA de la invención puede ser preendurecido fuera del organismo, cargado con el agente biológico o la(s) célula(s) deseados e implantado en un tiempo posterior. Este procedimiento es útil en aquellas situaciones en las cuales no son esenciales formas personalizadas, y en las que se desea la producción de un gran número de implantes.

55 En general, la reacción de formación de la presente invención es finalizada después de la aplicación en el lugar quirúrgico. El material se endurece típicamente en menos de cinco horas, y sustancialmente se endurece un tiempo de una a cinco horas aproximadamente, bajo condiciones fisiológicas. Preferiblemente, el material se endurece sustancialmente en 10-30 minutos aproximadamente. La consistencia y la moldeabilidad del material de PCA, así como la velocidad de la reacción de formación, pueden variarse de acuerdo con la necesidad terapéutica mediante la modificación de unos cuantos parámetros sencillos.

60 La capacidad de reabsorción del material de PCA empleado en la presente invención, es atribuible a la combinación de su porosidad, su composición química y su cristalinidad. Las apatitas tienen caracteres cristalinos reducidos y muestran una solubilidad algo incrementada en sistemas acuosos cuando se comparan con especies más cristalinas. Se cree que la baja cristalinidad del material de PCA de la invención y/o la presencia de dominios amorfos estables en el mismo, estimula su capacidad de reabsorción en los sistemas biológicos.

65 La capacidad de reabsorción del material de PCA de la presente invención puede ser modificada alterando su densidad y/o su porosidad. La porosidad facilita la difusión de sustancias hacia y desde el interior del material y, en ciertas aplicaciones, la penetración de células y de prolongaciones celulares en la matriz del material. Los materiales

ES 2 299 183 T3

para administración de fármacos de menor porosidad tienden a reabsorberse más lentamente *in vivo* que los de mayor porosidad. En una realización de la invención, la porosidad es incrementada mediante la utilización de una mezcla seca de reactivos con tamaño de partícula controlado; en otras realizaciones se emplean técnicas de mordentado químico o físico y lixiviación.

5 Por tanto, diferentes realizaciones de la presente invención proporcionan materiales de PCA con diferentes tasas de reabsorción. La selección de reactivos, de la porosidad, de la cristalinidad final, y las cantidades y tipos de inhibidores de la cristalización empleados produce diferentes realizaciones del material de PCA de la presente invención, de tal manera que, en diferentes realizaciones, 1 g de material es reabsorbido (esto es, al menos un 80%, preferiblemente un 90-95% y muy preferiblemente >95%, reabsorbido) en cualquier periodo de tiempo deseado desde 2 semanas hasta 1, 3, 6 ó 9 meses, a 1 año.

15 En una realización preferida de la presente invención, la reacción que produce el material de PCA es iniciada por la adición de solución salina fisiológica a una mezcla de dos componentes secos, de tal manera que se forma una pasta espesa que se endurece en media hora aproximadamente. Pueden utilizarse en lugar de solución salina otros agentes acuosos tales como suero, medio de cultivo de tejidos u otra solución tamponada o agua destilada. Muy a menudo, el material de PCA reabsorbible resultante será "deficiente en calcio", con una proporción de calcio respecto a fosfato menor de 1,5 en comparación con el valor estequiométrico ideal de 1,67 aproximadamente para la hidroxiapatita.

20 La invención proporciona un ensayo para identificar materiales de PCA y precursores reactivos adecuados. Específicamente, los precursores son combinados, hidratados con una cantidad limitada de agua (a fin de que se forme una pasta o masilla) y se dejan endurecer para dar lugar al material de PCA. Los precursores deseables son capaces de endurecerse en un entorno húmedo a la temperatura corporal o a una temperatura próxima a la corporal. El producto endurecido es colocado posteriormente intramuscularmente o subcutáneamente en un animal de ensayo. Los materiales deseables son aquéllos que, cuando son implantados como una pastilla de al menos 1 g son reabsorbidos al menos un 80%, preferiblemente un 90-95% y muy preferiblemente >95% en 1 año (o menos). Preferiblemente, el material puede ser totalmente reabsorbido. En general, es más fácil analizar la reabsorción de cantidades de gramos del material en lugares subcutáneos.

30 El material de PCA de la presente invención se forma en una reacción que emplea al menos un precursor de fosfato de calcio amorfo (ACP), preferiblemente un ACP activado (ver, por ejemplo, los Ejemplos 1-4). En algunos casos, la reacción puede emplear únicamente un ACP precursor, que es convertido de manera controlada en parte o en la totalidad del material de PCA de la invención. Alternativamente, la reacción puede emplear un promotor que comprenda uno o más precursores adicionales (preferiblemente una o más fuentes de calcio y/o fosfato), que se combinen con el ACP para dar lugar al material de PCA de la invención. Además, puede emplearse un promotor no participante con el fin de facilitar la conversión del ACP activado en el material del PCA de la invención. En cualquier caso, se prefieren enormemente las reacciones que pueden ser iniciadas fuera del organismo, que pueden ser llevadas a cabo en una configuración semejante a una pasta y que se aceleran significativamente a 37°C dando lugar a un producto de fosfato de calcio endurecido.

40 La conversión del ACP en el material de PCA es estimulada en presencia de agua. Generalmente, el ACP es proporcionado como un polvo que se combina con cualquiera de los demás reactivos (por ejemplo un segundo fosfato de calcio) y es expuesto a una cantidad limitada de agua, de tal manera que se forma una pasta o masilla. El precursor hidratado se endurece posteriormente y el endurecimiento está asociado con la formación del material de PCA. Es un objetivo de esta invención el proporcionar métodos que estimulen la conversión del ACP en un material de PCA de manera controlada, produciendo una pasta o masilla del precursor hidratado que se endurece predeciblemente y que tiene utilidad en aplicaciones dentales, ortopédicas, de administración de fármacos, de terapia celular y/o en otras aplicaciones. Los promotores utilizados para llevar a cabo esta conversión pueden ser convertidos ellos mismos en el material de PCA, o bien pueden participar en otras reacciones químicas o físicas. Algunos promotores preferidos pueden permanecer también inalterados durante la conversión, proporcionando una función catalítica o nucleadora. A este respecto, son particularmente adecuadas las sustancias que proporcionan superficies reactivas que estimulan débilmente la cristalización para producir fosfato de calcio PCA.

55 *Precursores de ACP únicamente:* Cuando se utiliza fosfato de calcio amorfo como único precursor para producir un material de PCA reabsorbible, es importante controlar la tendencia natural del ACP para convertirse en hidroxiapatita altamente cristalina. Por otra parte, el transcurso de la conversión en el tiempo debe ser suficientemente rápido para que tenga utilidad quirúrgica. Un procedimiento es combinar un ACP precursor que contenga un inhibidor de la formación de cristales (por ejemplo, el ACP del Ejemplo 1) con un ACP que no contenga un inhibidor de la formación de cristales (por ejemplo, un promotor). Los reactivos pueden ser mezclados en estado seco, con el tamaño de partícula apropiado y un exceso del ACP que contiene el inhibidor. Los reactivos pueden ser expuestos posteriormente a condiciones para la formación de cristales tales como la adición de agua, seguido por una elevación de la temperatura (por ejemplo, como ocurre después de la introducción en el organismo), con el fin de convertir los reactivos en el material de PCA de la invención. Otros métodos de conversión controlada implican la utilización de catalizadores.

65 *Precursor de ACP más fuentes adicionales de fosfato de calcio:* El ACP puede hacerse reaccionar con una segunda fuente de calcio (incluyendo un segundo ACP) utilizando cualquier técnica que estimule la reacción. En las realizaciones preferidas, la segunda fuente de calcio es por sí misma un promotor. La reacción que está siendo estimulada es la conversión de un fosfato de calcio amorfo en un fosfato de calcio apatítico endurecido nanocristalino o débilmente

5 cristalino. Tales reacciones incluyen reacciones ácido/base, de desplazamiento, de sustitución y de hidrólisis, así como reacciones puramente físicas y mecánicas (por ejemplo, triturado, mezclado). Puede emplearse también la conversión catalítica, tal como la conversión del ACP en un material de PCA catalizada por la superficie. Bajo cualquier esquema de reacción, es importante que el ACP conserve el carácter amorfo significativo a lo largo de toda la reacción. Especí-
ficamente, la cristalinidad global en el ACP de partida no debe ser superior a la deseada en el producto final. Por tanto, ciertos esquemas de reacción pueden requerir la estabilización de la naturaleza amorfa del ACP a lo largo de todo el periodo de la reacción. Ejemplos de inhibidores de la formación de cristales que son conocidos en la técnica y son útiles para tal estabilización incluyen carbonato, pirofosfato y magnesio.

10 En algunas realizaciones preferidas, el componente ACP es activado bajo calor con el fin de facilitar la conversión que es estimulada por el segundo reactivo que contiene calcio o por otro promotor. Ejemplos de tales segundos reacti-
vos promotores adecuados incluyen DCPD, otros fosfatos de calcio cristalinos o débilmente cristalinos, fuentes de calcio, fuentes de fosfato o un segundo ACP. Pueden emplearse también otros métodos para estimular la conversión,
15 tal como la catálisis o la utilización de solventes iónicos o de promotores de la nucleación, para estimular la reacción entre los sustituyentes. El segundo reactivo de fosfato de calcio puede tener cualquier estructura cristalina y debe ser
elegido de tal manera que sea reactivo con el primer ACP, ya sea directamente o a través de la utilización de vehícu-
los que estimulen la reacción tales como solventes iónicos o catalizadores. Las condiciones de reacción apropiadas
serán determinadas mediante la demostración de un endurecimiento rápido a 37°C una vez que los reactivos han sido
mezclados y se ha añadido agua.

20 La reacción de formación del vehículo para administración puede ser también diseñada para que produzca un producto final que sea poroso. En una realización, la utilización de una mezcla seca de reactivos con tamaño de
partícula controlado da lugar a un material poroso. Pueden emplearse otros métodos para estimular la porosidad, tal
como el mordentado químico o físico y la lixiviación.

25 La presente invención proporciona un nuevo proceso para activar un precipitado de fosfato de calcio amorfo estándar para dar lugar a sólidos amorfos altamente reactivos. Los sólidos amorfos pueden ser utilizados en las reacciones
anteriormente descritas para formar un fosfato de calcio apatítico sintético débilmente cristalino o nanocristalino que
proporcione bioactividad, capacidad de biorreabsorción e integridad estructural. El nuevo material amorfo puede ha-
cerse reaccionar con otros fosfatos de calcio a, o por debajo de, 37°C para formar un material similar al hueso que
30 consta de fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino.

35 Las reacciones ácido-base de la técnica anterior de los fosfatos de calcio cristalinos convencionales producen sólidos que reaccionan muy poco, con productos de reacción que son demasiado cristalinos para ser suficientemente
reabsorbibles en los tejidos vivos. Las reacciones de la técnica anterior son generalmente incompletas y los productos
de reacción no son homogéneos. En contraste, el fosfato de calcio amorfo de la presente invención reacciona rápida-
mente y completamente con una amplia variedad de fosfatos de calcio y otros materiales portadores de calcio o fósforo
para proporcionar un producto homogéneo.

40 El origen de la reactividad incrementada del ACP de la presente invención no se conoce completamente; sin embargo, se cree que está asociada con la condición de amorfo (falta de cristalinidad) y, en algunas realizaciones, se
crean en el material por el proceso de la presente invención huecos en los lugares de pares iónicos. Los huecos pueden
proporcionar sitios reactivos para una reacción posterior. Estas observaciones serán discutidas con más profundidad
posteriormente.

45 El método de la presente invención permite la formación inicial de partículas de fosfato de calcio amorfo menores
de 1000 Å, preferiblemente de 200-500 Å y muy preferiblemente de 300 Å, cuyo crecimiento posterior está restringido
por la rápida precipitación del producto desde la solución. Durante la reacción de las fuentes de iones calcio y fosfato
para formar un fosfato de calcio amorfo, un tercer ión es introducido en la solución, de tal manera que este tercer
50 ión es incorporado a la estructura del precipitado amorfo en lugar del(los) grupo(s) PO_4^{3-} trivalente(s). Como algo
del PO_4^{3-} es sustituido por el tercer ión, el PO_4^{3-} total disminuye, aumentado de este modo la proporción Ca/P del
precipitado amorfo (en comparación con el fosfato de calcio amorfo estándar) y modificando la valencia o el estado de
carga del fosfato de calcio. Los sólidos amorfos pueden ser posteriormente liofilizados rápidamente para conservar las
propiedades químicas y físicas del material. Los sólidos amorfos pueden ser tratados posteriormente bajo condiciones
55 específicas seleccionadas para estimular la eliminación de al menos parte del tercer ión. Cuando el tercer ión es car-
bonato, condiciones de temperatura y presión específicas dan lugar a la reducción del carbono total, presumiblemente
como dióxido de carbono gaseoso procedente del sólido amorfo, mientras que se mantiene la amorfía del producto.

60 El material resultante es un sólido amorfo con una proporción Ca/P más elevada que la que se encuentra típicamen-
te en los fosfatos de calcio amorfos, en los que la proporción descrita generalmente en el pasado era de 1,50. Además,
la eliminación del carbono del material tiene como resultado huecos en la estructura intersticial de los sólidos amorfos,
convirtiéndolos en un sólido altamente reactivo. Puede haber varias fuentes de huecos posibles. El material posee una
porosidad que estimula la reactividad por varios medios, tal como un área superficial incrementada. El material puede
65 experimentar también un cambio del equilibrio estequiométrico tras la eliminación del tercer ión. Este cambio este-
quiométrico puede tener como resultado un desequilibrio de cargas que es responsable de la reactividad incrementada
del fosfato de calcio amorfo.

ES 2 299 183 T3

Es deseable mantener el carácter amorfo sustancial en el material a lo largo del proceso completo. Se ha encontrado que el sólido es menos reactivo si se introduce cristalinidad en su totalidad (regiones cristalinas individuales), o incluso en dominios locales (regiones microcristalinas), en exceso durante el proceso o en el producto final. El fosfato de calcio altamente reactivo resultante es amorfo por naturaleza y tiene una proporción de calcio respecto a fósforo en el rango de 1,55 a 1,65. En una realización preferida, el fosfato de calcio amorfo tiene una proporción Ca/P de 1,58 aproximadamente.

El estado amorfo del fosfato de calcio amorfo es inducido controlando la velocidad y la duración del proceso de precipitación. El fosfato de calcio amorfo de la presente invención es precipitado de la solución bajo condiciones en las que la precipitación inicial es rápida. La precipitación rápida tiene como resultado la formación de muchos núcleos de fosfato de calcio extremadamente pequeños. Adicionalmente, un crecimiento rápido del cristal o del grano da lugar a la producción de más defectos en cada grano, incrementando también de este modo la solubilidad. En el extremo final del espectro, el crecimiento del cristal o del grano es tan rápido y la densidad del defecto es tan significativa que tiene como resultado un fosfato de calcio amorfo. El fosfato de calcio amorfo es como un gel e incluye soluciones de sólidos con composiciones variables. Estos gels no tienen una estructura de largo alcance, pero son homogéneos cuando se miden en una escala de Angstroms. Bajo condiciones fisiológicas, estos compuestos amorfos tienen elevadas solubilidades, tasas elevadas de formación y tasas elevadas de conversión en fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino.

Los sólidos de fosfato de calcio amorfo adquiridos por este método conservan su naturaleza amorfa durante un tiempo suficientemente largo para ser introducidos en la reacción final como sólidos sustancialmente amorfos. Pueden ser también mezclados y reaccionados con otros sólidos o soluciones que contengan fosfatos con el fin de obtener sólidos que contengan una distribución homogénea de cristales con un tamaño de nanómetros. Además, en las realizaciones preferidas, como el fosfato de calcio amorfo reacciona completamente con los demás sólidos, la proporción Ca/P del sólido resultante constituirá el calcio y el fósforo total de tal reacción, esto es, habrá una reacción esencialmente completa. Cuando una concentración molar apropiada de fosfato procedente de la solución o de los sólidos se hace reaccionar con el nuevo material de fosfato de calcio amorfo, se obtiene un material de fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino (Ca/P 1,1-1,9). Por tanto, la presente invención permite diseñar y modificar y la composición química del producto resultante, proporcionando así un modo adicional de controlar la bioactividad del producto final utilizado como vehículo para administración o como soporte de células.

En una realización de la presente invención, se prepara una solución que contiene iones calcio y fosfato y un tercer ión en una concentración, a un pH y a una temperatura que estimularán la nucleación y precipitación rápidas de fosfato de calcio. Cuando la precipitación es suficientemente rápida, se forma un fosfato de calcio amorfo similar a un gel. Como la forma cristalina termodinámicamente favorecida de la hidroxiapatita es mejorada por la reducción de la velocidad de reacción, pueden llevarse a cabo ciertas etapas de procesamiento para incrementar la velocidad de reacción con el fin de asegurar que se obtenga un compuesto amorfo. Los factores siguientes, entre otros, deben ser tenidos en cuenta cuando se diseñe una solución para la precipitación rápida del fosfato de calcio amorfo de la presente invención.

Condiciones preferidas: Mezcla rápida de las fuentes de calcio y fosfato para incrementar la velocidad de reacción. La velocidad de reacción es incrementada con el fin de favorecer las fases no estables como producto. El permitir más tiempo de reacción para que cada uno de los iones se yuxtaponga correctamente para formar un sólido, tendrá como resultado una estructura cristalina y estable más termodinámicamente favorable.

Fuentes preferidas de calcio y fosfato: La utilización de soluciones muy concentradas o casi sobresaturadas asegurará el que tenga lugar una reacción más rápida.

Temperatura preferida: Aunque la reacción puede ser llevada a cabo a temperatura ambiente, temperaturas próximas al punto de ebullición para incrementar la concentración de un reactivo representan un medio posible para incrementar la velocidad de reacción.

En una realización, los iones de calcio, los iones de fosfato y los iones de carbonato son mezclados rápidamente en una solución acuosa con el fin de obtener un sólido de fosfato de calcio amorfo conteniendo carbonato. Las concentraciones relativas de los iones son seleccionadas para dar lugar a un precipitado que tenga la proporción Ca/P deseada. El ión carbonato sustituye a un ión fosfato en el fosfato de calcio amorfo. El fosfato de calcio amorfo carbonatado puede ser obtenido mediante precipitación a partir de una solución acuosa de carbonato. Las soluciones acuosas de carbonato adecuadas incluyen, solamente a manera de ejemplo, una solución de bicarbonato, una solución de carbonato de sodio, una solución de carbonato de potasio. Se contempla además como dentro del ámbito de la invención la utilización de soluciones no acuosas.

La utilización de un material carbonatado es deseable porque permite la manipulación de la proporción Ca/P por la sustitución del PO_4^{3-} por el CO_3^{2-} . Adicionalmente, se sabe que la presencia de CO_3^{2-} retrasa el desarrollo de la cristalinidad en el fosfato de calcio amorfo. Es reconocido, sin embargo, que otros iones o una mezcla de iones pueden ser adecuados en lugar de, o además de, el ión carbonato para modificar la proporción Ca/P y para introducir huecos en sitios reactivos del fosfato de calcio amorfo, tal como, a manera de ejemplo únicamente, iones nitrato, nitrito, acetato, Mg^{2+} y $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$.

ES 2 299 183 T3

El precipitado de fosfato de calcio amorfo puede ser recogido y filtrado antes de la activación. Se prefiere llevar a cabo esta etapa en una cámara fría o a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente con el fin de conservar el estado amorfo del precipitado recogido. La recogida puede ser llevada a cabo típicamente mediante cualquier medio convencional incluyendo, pero sin limitarse en absoluto a, filtración por gravedad, filtración en vacío o centrifugación. El precipitado recogido es gelatinoso y es lavado más de una vez con agua destilada.

El precipitado lavado es secado posteriormente bajo cualquier condición que mantenga el carácter amorfo del material. La liofilización es una técnica adecuada, pero no exclusiva. El precipitado es congelado y, mientras se mantiene congelado, es secado para eliminar la mayor parte del líquido retenido. Este procedimiento puede ser realizado colocando el precipitado congelado en una cámara de vacío durante un periodo de tiempo dado. La liofilización tiene lugar típicamente a temperaturas de nitrógeno líquido durante un tiempo en el rango de 12-78 horas, preferiblemente en 24 horas aproximadamente, y bajo un vacío en el rango de 10^{-1} - 10^{-4} , preferiblemente 10^{-2} torr. Un método preferido incluye la liofilización, ya que las temperaturas criogénicas utilizadas típicamente en la liofilización inhiben la cristalización posterior del material. Como resultado, el fosfato de calcio amorfo obtenido de este modo es un polvo extremadamente fino que fluye libremente.

El ACP secado puede ser posteriormente activado. En una realización preferida, cuando está presente carbonato en el ACP, el polvo de ACP es calentado para expulsar el agua libre restante y el agua de hidratación y para eliminar el carbono, presumiblemente mediante la descomposición del CO_3^{2-} en CO_2 y oxígeno. La etapa de calentamiento se lleva a cabo a una temperatura menor de 500-600°C pero superior a 425°C, con el fin de impedir la conversión del fosfato de calcio amorfo en hidroxiapatita cristalina. El calentamiento es llevado a cabo preferiblemente a una temperatura en el rango de 450-460°C, preferiblemente durante un tiempo de 1/2 hora a 6 horas.

La baja cristalinidad y los huecos en sitios reactivos (cambios de la porosidad y/o estequiométricos) pueden ser la causa de la reactividad más elevada observada del fosfato de calcio amorfo activado de la presente invención. Esto está ejemplificado por las observaciones siguientes. Se observa que un fosfato de calcio amorfo que contiene carbonato y que ha sido calentado a 525°C posee un incremento de la formación de hidroxiapatita cristalina y tiene una disminución correspondiente de la reactividad. El fosfato de calcio amorfo que es calentado únicamente a 400°C conserva su característica amorfa, pero presenta una reactividad disminuida. Presumiblemente, esta disminución de la reactividad está relacionada con los mayores niveles de carbonato (y menos huecos en los sitios reactivos) observados mediante IR en las muestras tratadas a esta temperatura más baja. Estos hallazgos sugieren que la amorficidad y el contenido en carbono disminuido (sitios reactivos libres) son un factor en la reactividad. Esto no tiene la intención de ser en absoluto una base exclusiva de la reactividad. Se considera que otras bases de la reactividad observada están dentro del ámbito de la invención. El polvo de fosfato de calcio amorfo resultante es un material de fosfato de calcio amorfo altamente reactivo con una proporción Ca/P de entre 1,1-1,9, preferiblemente de 1,55 a 1,65 aproximadamente y muy preferiblemente de 1,58 aproximadamente. El polvo ha sido caracterizado mediante una variedad de técnicas analíticas.

En la Figura 1, se muestra una micrografía electrónica de transmisión de alta resolución para mostrar las características morfológicas y la naturaleza del tamaño en el orden de Angstroms del fosfato de calcio amorfo reactivo preferido de la presente invención. Los tamaños de partícula preferidos son menores de 1000 Å, preferiblemente en el rango de 300-400 Å. Observar los límites poco nítidos que separan las agrupaciones similares a glóbulos, carentes de bordes y superficies claras, en contraste con los materiales cristalinos.

La naturaleza amorfa del ACP reactivo de la invención se caracteriza por un patrón de rayos X carente de picos pronunciados en cualquier posición de los ángulos de difracción que corresponden a los fosfatos de calcio cristalinos conocidos (Figura 4a). La medida de la Ca/P llevada a cabo utilizando análisis de rayos X de longitud de onda dispersa en una microsonda electrónica del mismo material después del tratamiento con calor hace que la Ca/P sea de 1,58 (Figura 2).

Estas caracterizaciones demuestran que aunque haya un cambio en el resto local de ciertos grupos de los sólidos de fosfato de calcio amorfo, la amorficidad global se mantiene a lo largo de todo el proceso.

En otra realización preferida, el fosfato de calcio amorfo altamente reactivo se hace reaccionar con un segundo fosfato de calcio para obtener un material de PCA. Según se discutió anteriormente, la hidroxiapatita cristalina es el producto de reacción termodinámicamente preferido, y se describe normalmente como no reabsorbible bajo condiciones fisiológicas. La utilización de un fosfato de calcio amorfo, que puede convertirse rápidamente y completamente para producir un compuesto apatítico sin una cristalización significativa, proporciona una nueva vía para un fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino que es reabsorbible bajo condiciones fisiológicas.

El polvo de fosfato de calcio amorfo de la presente invención puede ser mezclado con un promotor y convertirse de este modo para formar un material de PCA. Esta reacción puede tener lugar a temperatura ambiente después de la mezcla del polvo con cualquiera de una variedad de fosfatos de calcio ácidos y básicos en presencia de una cantidad limitada de un fluido tal como, pero sin limitarse a, agua, solución salina, solución tampón, suero o medio de cultivo de tejidos. Dependiendo de la cantidad de fluido añadida, la mezcla de fosfato de calcio amorfo de la presente invención y un segundo fosfato de calcio tiene como resultado una pasta con una elevada moldeabilidad y/o una elevada inyectabilidad con grados variables de consistencia de la pasta.

ES 2 299 183 T3

El método de preparación del promotor y/o del ACP afectará a la facilidad mediante la cual el precursor hidratado es convertido en el material de PCA. Según se indicó anteriormente, el método de mezclado de los reactivos en polvo antes de la adición del líquido afecta a la reactividad del sistema. De este modo, el mezclado a mano utilizando un mortero y una mano de mortero no tiene como resultado un sistema tan reactivo como una trituración prolongada con una máquina de los polvos reactivos. Por tanto, cuando se comparan promotores, es importante utilizar condiciones de preparación estandarizadas.

Se hipotetiza que la conversión del ACP en el fosfato de calcio PCA reactivo es un fenómeno catalizado por la superficie. Si es así, puede ser deseable producir un promotor particular con un área de la superficie reproducible. El área específica de la superficie del polvo de ACP y del promotor puede ser controlada con el fin de controlar las condiciones de reacción y las propiedades del material de PCA final. De este modo, para controlar la reproducibilidad de la reacción es ventajoso proporcionar un promotor con una distribución de tamaños de grano conocida. Las técnicas de tamizado estándar son adecuadas para la selección de tamaños de grano específicos. Se ha demostrado que el área de la superficie está correlacionada con la resistencia a la compresión y, posiblemente, con la porosidad y la capacidad de ser reabsorbido, del material de PCA.

Pueden utilizarse muchos compuestos que contienen calcio o fosfato como promotores participantes en la reacción de endurecimiento. Un promotor de fosfato de calcio puede tener cualquier estructura cristalina y debe ser elegido para que sea reactivo con el ACP directamente o mediante la utilización de promotores intensificadores. Los promotores participantes preferidos son aquellos que tienden por sí mismos a experimentar la conversión en hidroxiapatita a través de una fase de fosfato de calcio PCA intermedia.

Los fosfatos de calcio apropiados para ser utilizados como promotores con el ACP descritos en la presente incluyen fosfatos de calcio neutros, básicos y ácidos, preferiblemente fosfatos apatíticos, que proporcionan la estequiometría apropiada para la reacción para obtener un fosfato de calcio apatítico. En una realización preferida, se utiliza un fosfato de calcio ácido (pH 5-7). Los fosfatos de calcio adecuados incluyen, pero no se limitan en absoluto a, metafosfato de calcio, fosfato dicálcico dihidrato, decafosfato heptacálcico, fosfatos tricálcicos, pirofosfato de calcio dihidrato, el material apatítico débilmente cristalino de la invención, pirofosfato de calcio, fosfato octacálcico, fosfato tetracálcico y ACPs adicionales. Otros sólidos que proporcionarían una fuente de fosfato o de calcio tal como, a manera de ejemplo solamente, CaO, CaCO₃, acetato de calcio y H₃PO₄, pueden ser mezclados para formar un producto final con el fin de producir una proporción de Ca/P deseada próxima a 1,1-1,9 aproximadamente, preferiblemente de 1,3 a 1,5 aproximadamente. Puede ser deseable también proporcionar el segundo componente en el estado amorfo o débilmente cristalino.

Algunos promotores de fosfato de calcio pueden ser preparados como promotores débiles o como promotores potentes. Por ejemplo, una muestra de DCPD con un tamaño de grano en el rango de 100-125 μm (o distribución B3 en el Ejemplo 5) reacciona sólo marginalmente con el ACP altamente reactivo de la invención bajo ciertas condiciones (ver le Ejemplo 5). El DCPD de este tamaño de grano puede ser considerado como “promotor débil”. Por tanto, el DCPD puede ser utilizado en este formato para seleccionar ACPs altamente reactivos.

En algunas realizaciones de la invención, no se requiere que la reacción emplee un segundo fosfato de calcio participante para producir un material de PCA. En su lugar, está dentro del ámbito de la invención estimular simplemente el endurecimiento y la conversión del ACP reactivo en un material de PCA mediante la adición de uno o más promotores “pasivos” (denominados también promotores “no reactivos” o “no participantes”) que no participan en la reacción. Promotores pasivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, materiales o tratamientos que han sido descritos previamente como estimulantes de la conversión de materiales de fosfato de calcio en hidroxiapatita. Por ejemplo, pueden utilizarse como promotores pasivos agua, calor, nucleadores y catalizadores. En algunas realizaciones, los catalizadores proporcionan un área superficial, cuya presencia estimula el endurecimiento y la conversión del ACP en fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino. Por ejemplo, Al₂O₃, mica, vidrio y arena son, entre otras cosas, promotores pasivos útiles. En las realizaciones preferidas, se emplean materiales promotores que son insolubles o que tienen una baja solubilidad en agua, pueden ser preparados en forma granular en el rango de 1-200 μm de diámetro y son reabsorbibles *in vivo*. Así, polímeros tales como el ácido poli L-láctico (PLLA) y el ácido poliglicólico (PGA) son promotores particularmente deseables.

Cuando se emplea como promotor un segundo fosfato de calcio, el mismo es a menudo cristalino, según es puesto en evidencia por la presencia de picos de difracción pronunciados típicos del fosfato de calcio de interés en el patrón de difracción de rayos X (Fig. 4b). En contraste, el ACP reactivo es amorfo y no muestra picos identificables por difracción de rayos X (Fig. 4a). A pesar de su mayor cristalinidad, sin embargo, la difracción de rayos X sugiere que el difosfato dicálcico es consumido en la reacción con el ACP reactivo y el producto material de PCA tiene una cristalinidad mucho más reducida. De manera similar, cuando se emplea HA estequiométrico como segunda fuente de fosfato de calcio, es también consumido en la reacción y se produce un material de PCA de cristalinidad reducida.

Como al menos uno de los reactivos es amorfo y altamente reactivo, la reacción de formación de la presente invención procede a, o por encima de, la temperatura ambiente para proporcionar un material apatítico endurecido con una microestructura débilmente cristalina o microcristalina. En las realizaciones preferidas, la reacción de conversión es también sustancialmente completa, asegurando de este modo que todo el calcio y todo el fosfato de la mezcla sean consumidos por el producto PCA resultante. Este resultado permite la producción fiable de productos apatíticos simplemente por selección de las proporciones relativas del fosfato de calcio amorfo de partida y del fosfato de

calcio secundario. Es deseable mantener una proporción de calcio respecto a fosfato de 1,2-1,68 aproximadamente, preferiblemente menor de 1,5 y, muy preferiblemente de 1,38 aproximadamente.

El producto material apatítico contiene entornos lábiles característicos del hueso existente en la naturaleza. En el hueso existente en la naturaleza, los minerales se caracterizan por una estructura de tamaño nanométrico, proporcionando áreas superficiales elevadas para interactuar con el entorno tisular circundante, teniendo como resultado la reabsorción y la remodelación de los tejidos. La presente invención, con sus cristales de tamaño nanométrico como producto, remeda estrechamente los minerales óseos existentes en la naturaleza. Además, propiedades tales como la cristalinidad y las proporciones Ca/P son diseñadas cuidadosamente en la presente invención para simular las propiedades de los minerales encontrados en los tejidos vivos del hueso.

El PCA producido durante la reacción de la invención está asociado con el endurecimiento del material precursor hidratado. Debe señalarse, sin embargo, que aunque la conversión completa del precursor ACP es una realización preferida, el endurecimiento de los precursores hidratados puede tener lugar antes de la conversión completa o incluso en ausencia de una conversión completa. Se considera que tales reacciones de conversión parcial, pero no obstante de endurecimiento, están dentro del ámbito de la invención.

Según se mencionó anteriormente, la combinación de ACP seco con cualquier otro reactivo y una cantidad limitada de solución acuosa produce un precursor hidratado. Seleccionando la cantidad de líquido apropiada para ser añadida a los reactivos, puede ajustarse la viscosidad del mismo de acuerdo con la necesidad. El precursor hidratado puede ser preparado con una consistencia inyectable o modelable. Una consistencia inyectable significa tan denso como sea posible mientras sea capaz de pasar a través de una aguja de calibre 16 a 18. Muy a menudo, ésta será una consistencia similar a la de la "pasta de dientes". Modelable se refiere a una consistencia que permite al material conservar su forma. En el caso extremo de una consistencia modelable, el precursor hidratado tendrá la consistencia de una masilla de vidrio o de compuestos para calafatear. El precursor hidratado puede ser también preparado con un líquido suficiente para que sea a la vez inyectable y modelable. En la forma de pasta, el material tiene características de flujo notablemente mejoradas respecto a las composiciones de la técnica anterior. Las características de flujo son similares a las de la pasta de dientes, mientras que los materiales de la técnica anterior presentan generalmente una consistencia granular o similar a la harina de avena. El precursor hidratado puede ser preparado antes de su utilización, hasta un periodo de varias horas si se mantiene a temperatura ambiente y se minimiza la evaporación. El tiempo de almacenamiento puede ser prolongado manteniendo la pasta a temperaturas reducidas en el refrigerador en el rango de 1-10°C, siempre que se lleven a cabo etapas para minimizar la pérdida por evaporación.

En algunas realizaciones preferidas (por ejemplo, Ejemplos 9-14 siguientes), la reacción es endotérmica y tiene lugar lentamente a temperatura ambiente, pero se acelera significativamente a la temperatura corporal. Esto es particularmente útil en una situación quirúrgica, ya que la pasta formada mezclando los reactivos con agua permanece inyectable durante un periodo de tiempo considerable (hasta varias horas) mientras es mantenida a, o por debajo de, la temperatura ambiente. Por tanto, a temperatura ambiente (22°C aproximadamente) la pasta se endurece después de un tiempo mayor de una hora y permanece modelable y/o inyectable durante más de 10 minutos, preferiblemente durante más de una hora y, muy preferiblemente durante más de tres horas. Después de la inyección en el lugar del implante (37°C aproximadamente), la pasta se endurece en menos de una hora aproximadamente, preferiblemente en 10-30 minutos aproximadamente.

45 *Compuestos ("Composites") y Aditivos*

El material de PCA de la presente invención puede ser formado como un compuesto ("composite") con otras sustancias. Los compuestos ("composites") pueden ser deseables para cambiar cualquier número de parámetros físicos del vehículo incluyendo, pero sin limitarse a, la potencia, el tiempo de reabsorción, la adherencia, la inyectabilidad, las características de fricción o la capacidad para transportar el agente terapéutico o la cinética de liberación. En general, los expertos en la técnica de la fabricación de compuestos comprenderán los métodos y conceptos importantes en la fabricación de compuestos. Pueden obtenerse directrices adicionales para la preparación de compuestos del material de PCA en la solicitud de patente de Estados Unidos copendiente titulada "Bioresorbable Ceramic Composites", registrada en la misma fecha que la presente e incorporada a ésta por referencia.

55 *Formación de Implantes In Vitro*

Además de la aplicación quirúrgica en forma de pasta, los implantes de la invención pueden ser preformados fuera del organismo, endurecidos e implantados en forma sólida. Los dispositivos preformados pueden ser modelados a mano, moldeados o maquinados. La carga del agente terapéutico puede ser realizada por la adición del agente directamente al tampón o vehículo utilizado para preparar el precursor hidratado. Alternativamente, después del endurecimiento, el vehículo puede ser expuesto al agente terapéutico utilizando métodos de revestimiento por inmersión, laminado o pulverización.

65 *Agentes Biológicamente Activos*

Cualquier agente biológicamente útil puede ser administrado desde el implante del material de PCA de la invención. En general, el único requisito es que la sustancia permanezca activa en presencia del material durante la fabricación o que sea capaz de ser activada o reactivada posteriormente. Como la pasta de la invención puede ser

preparada con un gran número de vehículos acuosos o sustituyentes, a las personas en la técnica les serán familiares los aditivos específicos que pueden ser incluidos con el fin de mejorar la estabilidad del agente. La estabilidad y/o la compatibilidad de un agente particular con el material de la invención, así como las estrategias de fabricación, pueden ser analizadas empíricamente *in vitro*. Específicamente, el agente puede ser incorporado al material de la invención mediante uno o más de los métodos descritos en la presente. Después del endurecimiento del vehículo a 37°C, la sustancia puede ser lixiviada desde el material a un medio de análisis tal como agua o un tampón apropiado y el compuesto recogido a partir del material por difusión al medio de análisis. El medio de análisis puede ser posteriormente analizado para determinar la presencia del agente activo. En algunos casos, el material será desmenuzado, pulverizado o fragmentado de otro modo antes de ponerlo en contacto con el medio de análisis. Otros medios de análisis que no requieren difusión del agente, tales como el crecimiento de células sobre el material u otros ensayos físicos, químicos o biológicos serán conocidos por las personas con práctica en la profesión para compuestos específicos.

Los agentes biológicamente activos utilizados en la práctica de la presente invención son seleccionados del grupo de proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas y análogos de los mismos sintéticos o producidos biológicamente. Se incluyen también agentes químicos que tengan efectos biológicos (por ejemplo, antibióticos, colorantes, etc.). Las proteínas pueden ser preparadas mediante técnicas sintéticas, bioquímicas o recombinantes. Preferiblemente, aunque no necesariamente, el agente biológicamente activo es uno que haya sido considerado seguro y eficaz para ser utilizado por una agencia u organismo gubernamental apropiado. Por ejemplo, los fármacos aprobados para uso humano en Estados Unidos están enumerados por la Food and Drug Administration (FDA) bajo 21 C.F.R. §§ 330.5, 331-361 y 440-460; los fármacos aprobados para uso veterinario en Estados Unidos están enumerados por la FDA bajo 21 C.F.R. §§ 500-582.

El término “agente biológicamente activo” incluye sustancias farmacológicamente activas que producen un efecto local o sistémico en animales, plantas o virus. El término indica por tanto cualquier sustancia destinada a ser utilizada en el diagnóstico, la cura, el alivio, el tratamiento o la prevención de una enfermedad o en la mejora del desarrollo y de condiciones físicas o mentales deseables en animales, plantas o virus. El término “animal” utilizado en la presente quiere indicar mamíferos tales como primates (incluyendo humanos), ovejas, caballos, ganado, cerdos, perros, gatos, ratas y ratones; aves; reptiles; peces; insectos; arácnidos; protistas (por ejemplo, protozoos) y bacterias procarióticas.

Las clases de compuestos biológicamente activos que pueden ser cargados en el vehículo de administración de la presente invención pueden ser seleccionadas del grupo que consta de sustancias anti-SIDA, sustancias anticancerosas, inhibidores del ECA, antígenos, antagonistas adrenérgicos, antiácidos, inmunosupresores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, relajantes musculares y sustancias antiparkinsonianas, antiespasmódicos y contracturantes musculares, antidiarreicos, antieméticos, laxantes, diuréticos, mióticos y anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios y/o antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, antihistamínicos, agentes antitusivos, medicaciones antivértigo, antinértigicas y antimareo causado por movimiento, anestésicos locales, productos oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, antieméticos, agentes para la producción de imágenes, agentes vectorizantes específicos, factores tróficos, factores de crecimiento, inmunosupresores, inmunoactivadores, antimitóticos, neurotransmisores, proteínas, modificadores de la respuesta celular, vacunas, ácidos nucleicos, genes, fragmentos génicos, secuencias reguladoras de genes (tales como promotores, intensificadores u otros lugares reguladores), moléculas antisentido y otros restos bioactivos o componentes de las rutas biosintéticas.

Un listado más completo de las clases de compuestos adecuados para ser cargados en los vehículos de administración pueden encontrarse en la *Pharmazeutische Wirkstoffe* (Von Kleemann y col. (eds.), Stuttgart, New York, 1987), o en cualquiera de una variedad de libros de texto de farmacología disponibles, tales como *Lippincott's Illustrated Pharmacology Reviews* (Harvey y col. (eds.), J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 1992) o en *Examination & Board Review Pharmacology* (Katzing y col., Appleton & Lange, Connecticut, 1993), cada uno de los cuales se incorpora a la presente por referencia. Ejemplos de sustancias biológicamente activas particulares se presentan a continuación:

Los *factores angiogénicos* son sustancias que estimulan el crecimiento de la vasculatura e incluyen compuestos tales como *veg-f* y algunos factores de crecimiento y mitógenos.

Las *sustancias anti-SIDA* son sustancias utilizadas para tratar o prevenir el Síndrome de Deficiencia Autoinmune (SIDA). Ejemplos de tales sustancias incluyen CD4, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 9-(2-hidroxi-etoximetil)-guanina (aciclovir), ácido fosfonórfmico, 1-adamantanamina, péptido T y 2',3'-didesoxicidina.

Las *sustancias anticancerosas* son sustancias utilizadas para tratar o prevenir el cáncer. Ejemplos de tales sustancias incluyen antimetabolitos (tales como, por ejemplo, metotrexato, fluorouracilo, 5-fluorouracilo, citarabina, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina), antibióticos (tales como, por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina), agentes alquilantes (tales como, por ejemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, mostaza de uracilo, busulfán, carmustina, lomustina), venenos del huso mitótico (tales como, por ejemplo, vinblastina, vincristina), hormonas (tales como, por ejemplo, hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, dietilestilbestrol, propionato de testosterona, fluoximesterona) y otros agentes (tales como, por ejemplo, vindesina, hidroxiurea, procarbazona, aminoglutetimida, melfalán, clorambucilo, acarbazona (DTIC: dimetiltriazenomidazol carboxamida), arabinóxido de citosina).

Los *antibióticos* son reconocidos en la técnica y son sustancias que inhiben el crecimiento de, o destruyen, microorganismos. Los antibióticos pueden ser producidos sintéticamente o por microorganismos. Ejemplos de antibióticos incluyen agentes bactericidas tales como aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina, tobramicina, netilmicina, estreptomina, amikacina, neomicina), bacitracina, carbapenems (por ejemplo, imipenem/cislatatina), cefalosporinas, colistina, metenamina, monobactámicos (por ejemplo, aztreonam), penicilinas (por ejemplo, penicilina G, penicilina V, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina, piperacilina, mezlocilina, azlocilina), polimixina B, quinolonas y vancomicina; y agentes bacteriostáticos tales como cloranfenicol, ciindamian, macrólidos (por ejemplo, eritromicina, azitromicina, claritromicina), lincomian, nitrofurantoina, sulfonamidas, tetraciclinas (por ejemplo, tetraciclina, doxiciclina, minociclina, demeclocilina) y trimetoprim. Están también incluidos metronidazol, fluoroquinolonas y ritampina. Los antibióticos son proporcionados algunas veces en forma insoluble, la cual puede ser utilizada cuando se desea una administración retardada.

Los *agentes antivirales* son sustancias capaces de destruir o suprimir la replicación de los virus. Ejemplos de agentes antivirales incluyen a-metil-P-adamantano metilamina, 1,-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3 carboxamida, 9-[2-hidroxi-etoxi]metilguanina, adamantanamina, 5-yodo-2'-desoxiuridina, trifluorotimidina, interferón y arabinósido de adenina. Agentes particulares útiles en el tratamiento de los virus herpes incluyen aciclovir, vidarabina, idoxuridina y ganciclovir.

Los *inhibidores enzimáticos* son sustancias que inhiben una reacción enzimática. Ejemplos de inhibidores enzimáticos incluyen cloruro de edrofonio, N-metilfisostigmina, bromuro de neostigmina, sulfato de fisostigmina, tacrina HCl, 1-hidroximaleato de tacrina, yodotubercidina, p-bromotetramisol, clorhidrato de 10-(alfa-dietilaminopropionil)-fenotiazina, cloruro de calmidazolio, hemicolinio-3,3,5-dinitrocatecol, inhibidor I de la diacilglicerol quinasa, inhibidor II de la diacilglicerol quinasa, 3-fenilpropargilamina, acetato de N^o-monometil-L-arginina, carbidopa, 3-hidroxi-bencilhidrazina HCl, hidralazina HCl, clorgilina HCl, deprenilo HCl,L(-)-, deprenilo HCl,D(+)-, hidroxilamina HCl, fosfato de iproniazida, 6-MeO-tetrahydro-9H-pirido-indol, nialamida, pargilina HCl, quinacrina HCl, semicarbazida HCl, tranilcipromina HCl, clorhidrato de N,N,-dietilaminoetil-2,2-difenilvalerato, 3-isobutil-1-metilxantina, papaverina HCl, indometacina, clorhidrato de 2-ciclooctil-2-hidroxi-etilamina, 2,3-dicloro-a-metilbencilamina (DCMB), clorhidrato de 8,9-dicloro-2,3,4,5-tetrahydro-1H-2-benzazepina, p-aminoglutetimida, tartrato de p-aminoglutetimida,R(+)-, tartrato de p-aminoglutetimida,S(-)-, 3-yodotirosina, alfa-metiltirosina,L-, alfa-metiltirosina,DL-, acetazolamida, diclorfenamida, 6-hidroxi-2-benzotiazolsulfonamida y alopurinol.

Los *neurotoxinas* son sustancias que tienen un efecto tóxico a través de su acción sobre el sistema nervioso, por ejemplo sobre las células nerviosas. Las neurotoxinas incluyen neurotoxinas adrenérgicas, neurotoxinas colinérgicas, neurotoxinas dopaminérgicas, bloqueantes de los canales de calcio y otras neurotoxinas. Ejemplos de neurotoxinas adrenérgicas incluyen clorhidrato de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobencilamina. Ejemplos de neurotoxinas colinérgicas incluyen el clorhidrato de la mostaza de acetiletilcolina. Ejemplos de neurotoxinas dopaminérgicas incluyen 6-hidroxidopamina HBr, clorhidrato de 1-metil-4-(2-metilfenil)-1,2,3,6-tetrahydro-piridina, percolato de 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio, N-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina HCl, percolato de 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio, N-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetrahidropiridina HCl, yoduro de 1-metil-4-fenilpiridinio. Ejemplos de bloqueantes de los canales de calcio incluyen Ω -conotoxina y verapamilo.

Los *opioides* son sustancias con efectos similares a los opiáceos que no derivan del opio. Los opioides incluyen agonistas de opioides y antagonistas de opioides. Los agonistas de opioides incluyen sulfato de codeína, citrato de fentanilo, bitartrato de hidrocodona, loperamida HCl, sulfato de morfina, noscapina, norcodeína, normorfina, tebaína. Los antagonistas de opioides incluyen nor-binaltorfimina HCl, buprenorfina, clornaltrexamina 2HCl, funaltrexamina HCl, nalbufina HCl, nalorfina HCl, naloxona HCl, naloxonazina, naltrexona HCl y naltrindol HCl.

Los *hipnóticos* son sustancias que producen un efecto hipnótico. Los hipnóticos incluyen pentobarbital sódico, fenobarbital, secobarbital, tiopental y mezclas de los mismos, hipnóticos heterocíclicos, dioxopiperidinas, glutarimidias, dietil isovaleramida, a-bromoisovaleril urea, uretanos y disulfanos.

Los *antihistamínicos* son sustancias que inhiben competitivamente los efectos de la histamina. Ejemplos incluyen pirilamina, clorfeniramina, tetrahidrazolina, etcétera.

Los *lubricantes* son sustancias que incrementan la lubricidad del entorno en el cual son administradas. Ejemplos de lubricantes biológicamente activos incluyen agua y solución salina.

Los *tranquilizantes* son sustancias que proporcionan un efecto tranquilizante. Ejemplos de tranquilizantes incluyen clorpromazina, promazina, flufenazina, reserpina, deserpidina y meprobamato.

Los *anticonvulsivantes* son sustancias que tienen un efecto de prevención, reducción o eliminación de convulsiones. Ejemplos de tales agentes incluyen primidona, fenitoína, valproato, Chk y etosuximida.

Los *antiinflamatorios* son compuestos que inhiben la inflamación. Tipos diferentes de fármacos antiinflamatorios bloquean diferentes mediadores químicos. Ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDS), tales como aspirina, fenilbutazona, indometacina, sulindac, tolmetina, ibuprofeno, piroxicam, fenamatos, que tienen actividades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Están también incluidos analgésicos no narcóticos tales como acetaminofeno y fenacetina, aunque la actividad antiinflamatoria de estos fármacos es más

ES 2 299 183 T3

débil. Ciertos antiinflamatorios de acción lenta tales como sales de oro, cloroquina, D-penicilamina y metotrexato son útiles en el tratamiento de la artritis. Los antiinflamatorios específicos para la gota incluyen colchicina, alopurinol, probenecid y sulfinpirazona.

5 Los *relajantes musculares* y los *agentes anti-Parkinsonianos* son agentes que relajan los músculos o reducen o eliminan los síntomas asociados con la enfermedad de Parkinson. Ejemplos de tales agentes incluyen mefenesina, metocarbamol, clorhidrato de ciclobenzaprina, clorhidrato de trihexilfenidilo, levodopa/carbidopa y biperideno.

10 Los *antiespasmódicos* y *contracturantes musculares* son sustancias capaces de prevenir o aliviar los espasmos o contracciones musculares. Ejemplos de tales agentes incluyen atropina, escopolamina, oxifenonio y papaverina.

15 Los *mióticos* y *anticolinérgicos* son compuestos que producen broncodilatación. Ejemplos incluyen ecotiofato, pilocarpina, salicilato de fisostigmina, diisopropilfluorofosfato, epinefrina, neostigmina, carbacol, metacolina, betanecol, etcétera.

Los compuestos *antiglaucoma* incluyen betaxalol, pilocarpina, timolol, sales de timolol y combinaciones de timolol y/o sus sales con pilocarpina.

20 Los *antiparasitarios*, *antiprotozoos* y *antifúngicos* incluyen ivermectina, pirimetamina, trisulfapirimidina, clindamicina, anfotericina B, nistatina, flucitosina, ketoconazol, fluconazol, natamicina, miconazol, metronidazol, fluorato de diloxanida, paromomicina, cloroquina, emetina, deshidroemetina, estibogluconato de sodio (para la leishmaniasis), melarsoprol (para la tripanosomiasis), nifurtimox (para la tripanosomiasis), suramina (para la tripanosomiasis), pentamidona (para la tripanosomiasis) y agentes antimalaria (tales como, por ejemplo, primaquina, cloroquina, quinina, mefloquina, pirimetamina y cloroguanida).

25 Los *antihipertensivos* son sustancias capaces de contrarrestar la presión sanguínea elevada. Ejemplos de tales sustancias incluyen alfa-metildopa y el éster pivaloiloxietílico de la alfa-metildopa.

30 Los *analgésicos* son sustancias capaces de prevenir, reducir o mitigar el dolor y los *antipiréticos* son sustancias capaces de mitigar o reducir la fiebre. Ejemplos de tales sustancias incluyen aspirina, fenilbutazona, indometacina, sulindac, tolmetec, ibuprofeno, piroxicam, fenamatos, acetaminofeno, fenacetina, sulfato de morfina, sulfato de codeína, meperidina y nalorfina.

35 Los *anestésicos locales* son sustancias que tienen un efecto anestésico en una región localizada. Ejemplos de tales anestésicos incluyen procaína, lidocaína, tetracaína y dibucaína.

Los *agentes oftálmicos* incluyen agentes de diagnóstico tales como fluoresceína de sodio, rosa de bengala, metacolina, adrenalina, cocaína y atropina. Los aditivos quirúrgicos oftálmicos incluyen alfa-quitotripsina e hialuronidas.

40 Las *prostaglandinas* son conocidas en la técnica y son una clase de hidroxiácidos grasos de cadena larga químicamente relacionados existentes en la naturaleza, que tienen una variedad de efectos biológicos.

45 Los *antidepresivos* son sustancias capaces de prevenir o aliviar la depresión. Ejemplos de antidepresivos incluyen imipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, desipramina, amoxapina, doxepina, maprotilina, tranilcipromina, fenelzina e isocarboxazida.

Las sustancias *antipsicóticas* son sustancias que modifican el comportamiento psicótico. Ejemplos de tales agentes incluyen fenotiazinas, butirofenonas y tioxantenos.

50 Los *antieméticos* son sustancias que previenen o alivian las náuseas o los vómitos. Un ejemplo de tales sustancias incluye la dramamina.

55 Los *agentes para la creación de imágenes* son agentes capaces de crear una imagen de un lugar deseado, por ejemplo un tumor, *in vivo*. Ejemplos de agentes para la producción de imágenes incluyen sustancias que tienen una marca que es detectable *in vivo*, por ejemplo anticuerpos unidos a marcas fluorescentes. El término anticuerpo incluye anticuerpos completos o fragmentos de los mismos.

60 Los *agentes vectorizantes* específicos incluyen agentes capaces de administrar un agente terapéutico en un lugar deseado, por un ejemplo un tumor, y proporcionar un efecto terapéutico. Ejemplos de agentes vectorizantes incluyen agentes que pueden llevar toxinas u otros agentes que proporcionen efectos beneficiosos. El agente vectorizante puede ser un anticuerpo unido a una toxina, por ejemplo ricina A, o un anticuerpo unido a un fármaco.

65 Los *neurotransmisores* son sustancias que son liberadas por las neuronas tras una excitación y se desplazan para inhibir o excitar una célula diana. Ejemplos de neurotransmisores incluyen dopamina, serotonina, ácido γ -aminobutírico, norepinefrina, histamina, acetilcolina y epinefrina.

Los *factores tróficos*, *factores de crecimiento* y *modificadores de la respuesta celular* son factores cuya presencia continuada mejora la viabilidad o la longevidad de una célula. En algunos casos, producen efectos quimiotácticos o

tienen efectos protectores frente a toxinas o neurotoxinas, o frente a la neurodegeneración. Tales factores adecuados incluye, pero no se limitan a, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la proteína activadora de neutrófilos, la proteína quimioatrayente de monocitos, la proteína inflamatoria de macrófagos, el factor plaquetario, la proteína básica de plaquetas y la actividad estimulante del crecimiento de melanomas; el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento transformante (alfa), el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, el factor de crecimiento similar a insulina, el factor neurotrófico de crecimiento derivado de la glía, el factor neurotrófico ciliar, el factor de crecimiento transformante nervioso y el factor inductor del crecimiento del hueso/cartilago (alfa y beta) u otras proteínas morfogenéticas óseas.

Otros modificadores de la respuesta celular son las interleuquinas, inhibidores de interleuquinas o receptores de interleuquinas, incluyendo desde la interleuquina 1 hasta la interleuquina 10; interferones, incluyendo alfa, beta y gamma; factores hematopoyéticos, incluyendo eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; factores de necrosis tumoral, incluyendo alfa y beta; factores de crecimiento transformantes (beta), incluyendo beta-1, beta-2, beta-3, inhibina y activina; y proteínas morfogenéticas óseas tales como OP-1, BMP-2 y BMP-7.

Las *hormonas* incluyen estrógenos (tales como, por ejemplo, estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol, quinestrol, clorotrianiseno, etinil estradiol, mestranol), antiestrógenos (tales como, por ejemplo, clomifeno, tamoxifeno), progestinas (tales como, por ejemplo, medroxiprogesterona, noretindrona, hidroxiprogesterona, norgestrel), antiprogestina (mifepristona), andrógenos (tales como, por ejemplo, cipionato de testosterona, fluoximesterona, danazol, testolactona) y antiandrógenos (tales como, por ejemplo, acetato de ciproterona, flutamida). Las hormonas son utilizadas comúnmente para la terapia de sustitución hormonal y/o con fines anticonceptivos. Las hormonas esteroideas, tales como la prednisona, son también utilizadas como inmunosupresores y antiinflamatorios. La administración de hormonas esteroideas puede ser retardada mediante esterificación. Las hormonas tiroideas incluyen triyodotironina, tiroxina, propiltiouracilo, metimazol y yodixoda. Las hormonas hipofisarias incluyen corticotropina, somatotropina, oxitocina y vasopresina.

Los *ácidos nucleicos* son moléculas, incluyendo moléculas de ADN o ARN, que contienen uno o más nucleósidos y/o nucleótidos. Como se sabe que los compuestos de calcio estimulan la transfección celular y la captación de ADN en algunos sistemas, se anticipa que la reabsorción del presente dispositivo de administración puede mejorar la eficacia de la transfección. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser administradas como vacunas o, por ejemplo, como agentes antisentido. Alternativamente, pueden prepararse moléculas de ADN para utilización en terapia génica, en la cual las moléculas pueden corregir o compensar errores genéticos en las células en las cuales se van a introducir las moléculas de ADN.

En la técnica se conocen protocolos y regímenes estándar para la administración de los agentes anteriormente enumerados. Típicamente, estos protocolos están basados en la administración oral o intravenosa. Hasta el punto que la presente invención proporciona modos alternativos de administración, puede ser apropiada una modificación de estos protocolos.

Los agentes biológicamente activos son introducidos en un vehículo de administración proporcionado por el material de PCA de la presente invención durante o después de su formación (ver los Ejemplos 20-21). Los agentes pueden ser convenientemente mezclados en la pasta antes del endurecimiento. Alternativamente, el vehículo puede ser modelado y endurecido y expuesto posteriormente al agente terapéutico en solución. Este procedimiento particular es particularmente muy adecuado con proteínas, que se sabe que tienen afinidad por los materiales apatíticos. Puede emplearse una solución tampón que contenga el agente biológicamente activo, en lugar de agua, como solución acuosa en la cual el fosfato de calcio amorfo es convertido en el material apatítico sintético, débilmente cristalino, de la presente invención. Pueden utilizarse tampones en cualquier rango de pH, pero muy a menudo serán utilizados en el rango de 5,0 a 8,0. En las realizaciones preferidas, el pH será compatible con la estabilidad prolongada y la eficacia del agente terapéutico deseado y, en las realizaciones más preferidas, estará en el rango de 5,5 a 7,4. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbonatos, fosfatos (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) y tampones orgánicos tales como Tris, HEPES y MOPS. Muy a menudo, el tampón será seleccionado por su biocompatibilidad con los tejidos del huésped y por su compatibilidad con el agente terapéutico. Para la mayoría de las aplicaciones de ácidos nucleicos, péptidos o antibióticos bastará una simple solución salina tamponada con fosfato.

Los agentes biológicamente activos son introducidos en el vehículo en cantidades que permiten la administración de una dosis apropiada del agente al lugar del implante. En la mayoría de los casos, las dosificaciones se determinan utilizando directrices conocidas por los expertos y aplicables al agente particular en cuestión. Para aquellos agentes que se unen a un receptor, se prefiere generalmente conseguir niveles locales 1-2 veces mayores aproximadamente que la constante de disociación del complejo receptor-agente. Los niveles de carga, el tamaño del dispositivo y las propiedades de reabsorción pueden ser determinadas empíricamente mediante la utilización de modelos animales y de estudios de eficacia en humanos, como es común en la industria farmacéutica.

Una de las ventajas del presente material para administración, en comparación con los dispositivos cerámicos en general, y con los materiales de fosfato de calcio en particular, es que puede ser formado bajo condiciones de reacción suaves. Por ejemplo, aunque las cerámicas basadas en fosfato de calcio (por ejemplo hidroxiapatitas) han sido estudiadas extensamente como materiales potenciales para la administración de fármacos debido a su biocompatibilidad y a su afinidad conocida por los agentes proteicos, tales materiales son preparados típicamente en procesos que requieren

tener efectos nocivos sobre muchos agentes terapéuticos. Por ejemplo, algunos métodos requieren la sinterización por encima de 500°C, otros requieren la utilización de condiciones ácidas y otros más requieren periodos prolongados de tiempo para que se formen cristales conteniendo el agente terapéutico. En contraste, el presente vehículo para la administración de fármacos de PCA sintético puede ser preparado a temperatura ambiente y a pHs fisiológicamente relevantes (ver el Ejemplo 4). Por consiguiente, una amplia variedad de materiales biológicamente activos que podrían ser destruidos durante la preparación de los materiales de fosfato de calcio estándar puede ser incorporada al material para la administración de fármacos de la presente invención. Los agentes proteicos en particular son a menudo sensibles al calor y a otras condiciones desfavorables. El presente material de PCA sintético constituye por tanto un sistema de administración de agentes proteicos particularmente mejorado.

Modificación de la Cinética de Administración

Una ventaja del material de PCA de la presente invención es que la velocidad de reabsorción del material puede ser modulada mediante modificaciones de los métodos preparativos. Específicamente, los métodos que dan lugar a un producto endurecido más denso tendrán generalmente como resultado un tiempo de reabsorción más lento del fosfato de calcio PCA de la invención puro *in vivo*. A este respecto, hay una variedad de formas para alterar la densidad o la cinética de reabsorción del producto endurecido. Éstas incluyen el ajuste del volumen de líquido utilizado para crear la pasta, la alteración del tamaño de grano de los materiales de partida y la compresión de la pasta durante el endurecimiento. Pueden prepararse también compuestos ("composites"), en los cuales se incorporan a la pasta partículas o materiales lixiviables o biodegradables, y finalmente el material de PCA endurecido. Los materiales lixiviables o biodegradables pueden ser posteriormente eliminados (por ejemplo mediante lixiviación) del material endurecido *in vivo*, de tal manera que se produzca un implante muy poroso. Adicionalmente, el material de PCA de la invención puede ser preparado con una distribución de densidades dentro del mismo implante. Una forma en la que esto puede ser realizado es mediante la preparación de un material de PCA endurecido *in vitro* de una densidad, la pulverización del material endurecido hasta un tamaño de grano deseado y la mezcla posterior del material pulverizado con una segunda pasta de material de PCA diseñada para producir un material de PCA de densidad diferente. Los materiales de PCA producidos de esta forma se reabsorberán asincrónicamente.

La utilización de un material de tamaño de grano total más pequeño para preparar el polvo precursor del material de PCA tiene como resultado un tiempo mayor de reabsorción y/o reosificación *in vivo* (ver los Ejemplos 5 y 19). Como el precursor ACP es generalmente preparado con un tamaño de grano muy pequeño, cuando se utilizan dos componentes para producir el vehículo de la invención, el tamaño de grano del otro componente que no es ACP es utilizado generalmente para ajustar el tiempo de reabsorción. A este respecto, el tamaño de grano puede ser ajustado mediante la utilización de un segundo componente triturado y tamizado para seleccionar una distribución específica de tamaños de grano para la adición a la mezcla final. En otra realización, el segundo componente es triturado con el ACP durante cantidades variables de tiempo para influir sobre la velocidad de reabsorción.

Los materiales compuestos ("composites") con una cinética de reabsorción alterada son producidos mediante la incorporación al material de PCA de un "modificador de la velocidad de erosión", que es un material cuya presencia altera la velocidad de reabsorción del dispositivo en su totalidad. Los modificadores de la velocidad de erosión que incrementan la velocidad a la cual se reabsorbe el dispositivo para la administración de fármacos, incluyen cualquier compuesto lixiviable o biodegradable que afecte a la solubilidad (por ejemplo alterando la porosidad) del dispositivo a lo largo del tiempo *in vivo*. Los modificadores de la velocidad de erosión que disminuyen la velocidad a la cual se reabsorbe el dispositivo para la administración de fármacos, incluyen fosfatos de calcio cristalinos, particularmente hidroxiapatita, y compuestos difosfato.

Otra forma en la que puede ser modulada la velocidad de reabsorción del material de PCA de la invención es mediante la acción de células osteoclasticas y/o macrófagos. Los osteoclastos, y posiblemente los macrófagos, digieren el hueso de forma natural. De acuerdo con la presente invención, las células osteoclasticas o los macrófagos, o factores que modulen su desarrollo y/o actividad, pueden ser administrados junto con un implante del material de PCA de la invención con el fin de acelerar o retrasar la velocidad de reabsorción del material de PCA.

Por ejemplo, puede emplearse cualquier agente que estimule directamente o indirectamente (por ejemplo, a través de los osteoblastos) la actividad o el desarrollo osteoclastico con el fin de incrementar la velocidad de reabsorción de un implante de material de PCA. A la inversa, puede emplearse cualquier agente que inhiba directamente o indirectamente la velocidad o el desarrollo osteoclastico con el fin de reducir la velocidad de reabsorción de un implante. Tales agentes estimulantes e inhibidores son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Athanasou, J. Bone Joing Surg., 78-A:1096, 1996 y Roodman Endocrine Rev. 17:308, 1996, cada una de las cuales se incorpora a la presente por referencia). Por ejemplo, se sabe que la interleuquina-1 (IL-1), los factores estimulantes de colonias (CSFs) tales como el CSF-(M) de macrófagos, el factor de crecimiento transformante α (TGF α), el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleuquina-6 (IL-6), la interleuquina-11 (IL-11), la interleuquina-3 (IL-3), la hormona paratiroidea (PTH), metabolitos de la vitamina D3 (por ejemplo, calcitriol), las prostaglandinas (bajo ciertas condiciones conocidas) y los radicales libres de oxígeno estimulan el desarrollo y/o la actividad osteoclastica. Cuando se utilizan CSFs, la administración posterior de 1,25-dihidroxivitamina D₃ puede estimular adicionalmente los osteoclastos; en contraste, la administración concomitante de factores estimulantes de colonias y 1,25-dihidroxivitamina D₃ inhibe los osteoclastos.

Otros factores que inhiben el desarrollo y/o la actividad osteoclastica incluyen el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el interferón- γ , la interleuquina-4 (IL-4), el óxido nítrico, anticuerpos contra, por ejemplo, el receptor de vitronectina de los osteoclastos, la calcitonina y las prostaglandinas (bajo ciertas condiciones conocidas).

5 Por supuesto, es también posible introducir los propios osteoclastos (o células precursoras de osteoclastos, preferiblemente en combinación con agentes que estimulen su diferenciación en osteoclastos) en un implante de material de PCA con el fin de estimular su reabsorción.

10 Los agentes que alteran la velocidad de reabsorción del material de PCA pueden ser administrados sistémicamente o localmente. La administración local se realiza preferiblemente introduciendo el agente en, o asociando el agente con, el propio material, preferiblemente de acuerdo con los procedimientos aquí descritos. Cuando se emplea administración local, es preferible que se minimice la difusión del agente lejos del implante del material de PCA. Por ejemplo, se prefieren agentes relativamente insolubles ya que menos probable que se difundan lejos del implante y ejerzan efectos indeseables sobre otras células del organismo.

15 *Aplicaciones*

20 Por ejemplo, el material puede ser utilizado para administrar los agentes biológicamente activos a una variedad de lugares de un organismo (preferiblemente un organismo humano, aunque son también posibles aplicaciones veterinarias). Alternativamente o adicionalmente, el material puede ser utilizado en tejido óseo o en aplicaciones de reparación o en terapia plástica de aumento *in vivo*. El material puede ser también empleado como una membrana o matriz de encapsulación de células, o en la construcción o reparación de un órgano artificial.

25 *In vitro*, el material puede ser utilizado como una matriz para el cultivo de células tridimensional, y como modelo para analizar cultivos de osteoclastos, osteoblastos, condrocitos y/o macrófagos, la diferenciación de células progenitoras y/o la reosificación y la reabsorción de fosfato de calcio. El material es particularmente útil para estudios de formación y/o degradación de tejidos, por ejemplo empleando células tales como células progenitoras, células madre, osteocitos, osteoclastos, osteoblastos, condrocitos, macrófagos, mioblastos y fibroblastos. El material puede ser también empleado para realizar la administración *in vitro* de un agente biológicamente activo.

30 Ciertas aplicaciones preferidas se discuten con más detalle posteriormente, pero la discusión está destinada únicamente a servir como ejemplo y no tiene la intención de ser limitante.

35 Cuando se utiliza como un vehículo de administración *in vivo* o *in vitro*, el material de PCA de la presente invención ofrece la ventaja de una administración controlada, localizada. Como es bien conocido, se requieren cantidades menores de agente biológicamente activo cuando el agente es administrado en un lugar específico en lugar de ser administrado sistémicamente. Además, los efectos tóxicos colaterales potenciales del agente se minimizan cuando el agente es administrado a partir del vehículo de administración de la presente invención. Además, la actividad del agente es maximizada ya que el mismo está protegido dentro del vehículo de administración hasta que es administrado a su lugar.

45 El material de PCA de la presente invención puede ser inyectado o implantado en cualquier tejido aceptable. Las formulaciones orales están también consideradas dentro del ámbito de la invención. Los lugares de administración preferidos incluyen lugares en hueso, músculo, médula espinal, sistema nervioso central, cavidad intraperitoneal, localizaciones subcutáneas y el humor vítreo y acuoso del ojo. Cuando el material de PCA es administrado a un sitio bajo circunstancias en las que la migración del implante es una preocupación, pueden incorporarse al vehículo suturas o ganchos de anclaje de tal manera que pueda ser fijado y mantenido en posición. Cuando sea apropiado, el material de PCA puede ser anclado mediante inserción en un lugar óseo (ver más adelante). Las aplicaciones particulares y los lugares de administración preferidos se discuten con más detalle a continuación:

50 *Administración de Agentes Biológicamente Activos a Lugares Óseos*

55 El material de PCA de la presente invención tiene ventajas particulares para administrar agentes biológicamente activos a lugares de un hueso. La implantación de un vehículo de administración formado a partir del material de PCA de la presente invención en un sitio óseo puede ser utilizada alternativamente o adicionalmente para anclar un vehículo de administración y llevar a cabo la administración sistémica de un fármaco, o puede ser utilizada para llevar a cabo la administración a un lugar adyacente a, aunque no literalmente "en", el hueso. La Figura 9 describe muchas aplicaciones útiles del material de PCA de la presente invención en lugares óseos.

60 El mineral óseo existente en la naturaleza está compuesto por fosfato de calcio débilmente cristalino, de un tamaño de nanómetros, con estructura apatítica. Sin embargo, a diferencia de la hidroxiapatita cristalina estequiométrica ideal, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, con una proporción atómica de Ca/P de 1,67, la composición del mineral óseo es significativamente diferente y puede ser representada por la fórmula siguiente:

65
$$\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_{1,7}(\text{OH}, \text{CO}_3)_{0,3}$$

El mineral óseo no estequiométrico es debido principalmente a la presencia de iones divalentes, tales como CO_3^{2-} y HPO_4^{2-} , que sustituyen a los iones PO_4^{3-} trivalentes. La sustitución por los iones HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} produce un cambio en la proporción Ca/P, teniendo como resultado una proporción Ca/P que puede variar entre 1,50 y 1,70, dependiendo de la edad y del lugar óseo. Generalmente, la proporción Ca/P aumenta durante el envejecimiento del hueso, sugiriendo que la cantidad de la especie carbonato aumenta típicamente en los huesos más viejos. Es la proporción Ca/P junto con el tamaño nanocristalino y la naturaleza débilmente cristalina, lo que produce la propiedad de solubilidad específica de los minerales óseos. Y como los tejidos óseos experimentan una reparación constante regulada por las células que reabsorben minerales (osteoclastos) y las células que producen minerales (osteoblastos), el comportamiento de solubilidad de los minerales es importante para mantener un equilibrio metabólico delicado entre estas actividades celulares.

El material de PCA de la presente invención es un sólido de nanotamaño, débilmente cristalino, con una proporción Ca/P comparable a la de los minerales óseos naturales. El material es biorreabsorbible, puede ser producido a bajas temperaturas y es fácilmente modelable e inyectable. Por todas estas razones, el material de la invención es particularmente muy adecuado para la administración de fármacos en lugares óseos. Además, este material de PCA sintético puede soportar el crecimiento óseo por lo que finalmente es sustituido por el propio hueso del paciente. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que el crecimiento óseo puede afectar mucho a la velocidad de reabsorción del material para la administración de fármacos de la presente invención. Por consiguiente, puede ser deseable en ciertas circunstancias (por ejemplo, cuando el agente biológicamente activo debe ser administrado de acuerdo con una pauta de administración precisa, predeterminada) reducir el crecimiento óseo en el vehículo para la administración de fármacos, por ejemplo mediante el bloqueo de la penetración de células osteocíticas o condrocíticas o de precursores. En la mayoría de las circunstancias, la osificación puede ser evitada colocando el dispositivo a cierta distancia del hueso. En general, será suficiente 1 mm, aunque se prefieren distancias mayores. Además, compuestos tales como el gen erizo indio y sus productos génicos, la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y agonistas del receptor de la PTHrP pueden ser incluidos en, sobre o adyacentes al dispositivo para la administración de fármacos con el fin de evitar el crecimiento óseo.

En otras circunstancias, tal crecimiento del hueso puede ser estimulado de forma deseable. Según se muestra en los Ejemplos 14, 17 y 18, el material de fosfato de calcio PCA puede colocarse en lugares óseos y dejar que se reabsorba de tal manera que tenga como resultado su sustitución completa (100%) aparente por hueso nuevo. Cuando se desea una osificación óptima, los dispositivos y objetos pueden ser sembrados con células formadoras de hueso (ver más adelante). Este objetivo se consigue muy fácilmente colocando el dispositivo en contacto con una fuente de las propias células formadoras de hueso del paciente. Tales células pueden ser encontradas en el tejido óseo o en la sangre o fluidos asociados con el hueso, incluyendo fluidos exógenos que hayan estado en contacto con el hueso o con materiales o regiones óseas, incluyendo el periostio, el hueso canceloso o la médula. En el caso de dispositivos tales como tornillos y agujas, cuya introducción en el hueso está acompañada por sangrado, no se requiere una siembra adicional. Para placas, que implican solamente al hueso cortical, se recomienda la inducción de una lesión en el periostio que contactará con el dispositivo. En otras realizaciones más, será útil preparar quirúrgicamente un alojamiento dentro del hueso mediante la extracción de una porción del hueso cortical en el lugar del implante. Pueden llevarse a cabo también otras etapas para aumentar la osificación, incluyendo la introducción en el injerto de células formadoras de hueso recogidas del paciente, o la incorporación de factores tróficos o de proteínas inductoras del crecimiento óseo en o sobre el dispositivo. Células óseas no autólogas están también dentro del ámbito de la invención si la cantidad deseada de regeneración ósea tiene lugar antes del rechazo por el huésped de las células formadoras de hueso. A este respecto, pueden administrarse inmunosupresores al receptor del dispositivo, en algunos casos mediante incorporación al dispositivo. Por tanto, células o tejidos obtenidos de fuentes primarias, líneas celulares o bancos de células pueden ser todos útiles en ciertas realizaciones.

Se espera que ciertas categorías de agentes biológicamente activos sean particularmente adecuadas para la administración a lugares óseos. Por ejemplo, cuando el vehículo para la administración de fármacos es aplicado a un lugar óseo lesionado, puede ser deseable incorporar al vehículo proteínas regeneradoras óseas (BRPs). Se ha demostrado que las BRPs incrementan la tasa de crecimiento óseo y aceleran la cicatrización del hueso (ver, por ejemplo, Appel y col., Exp. Opin. Ther. Patents 4:1461, 1994). BRPs ejemplares incluyen, pero no están limitadas en absoluto a, el Factor de Crecimiento Transformante Beta ($\text{TGF-}\beta$), Factores de Fijación Celular (CAFs), Factores de Crecimiento Endotelial (EGFs), OP-1 y Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs). Tales BRPs están siendo desarrolladas actualmente por el Genetics Institute, Cambridge, MA; Genentech, Palo Alto, CA y Creative Biomolecules, Hopkinton, MA. Pueden utilizarse también proteínas regeneradoras óseas y factores tróficos para estimular la formación de huesos ectópicos, si se desea. El material de PCA conteniendo BMP-7 puede ser colocado subcutáneamente, y la formación de hueso tendrá lugar en 1-2 meses.

Antibióticos y antisépticos son también administrados deseablemente a lugares óseos. Por ejemplo, una de las principales implicaciones clínicas que proceden de la cirugía de injertos óseos, es la necesidad de controlar la inflamación o la infección post-operatorias, particularmente la infección asociada con osteomielitis. Una realización de un dispositivo para la administración de fármacos, que incluya un antibiótico, podría ser utilizada como (o conjuntamente con) un injerto óseo mejorado para reducir las probabilidades de infección local en el lugar de la cirugía, contribuyendo a un proceso de cicatrización ósea libre de infección, y por tanto más rápido. La eficacia de los antibióticos es incrementada además mediante el control de la reabsorción de la hidroxiapatita débilmente cristalina, de tal manera que se disuelve a una velocidad que administra los péptidos antibióticos o su componente activo al lugar de reparación tisular, a la dosis más eficaz.

ES 2 299 183 T3

Ejemplos de antibióticos incluyen, pero no se limitan en absoluto a, penicilina, tetraciclina, kanamicina, gentamicina, clorhidrato de clortetraciclina (aureomicina), minociclina, dosicilina, vancomicina, bacitracina, neomicina, eritromicina, estreptomina, cefalosporinas, cloranfenicol, oxitetraciclina (tetramicina) y derivados de los mismos. Los antibióticos y las proteínas regeneradoras de hueso pueden ser incorporados juntos en el material de PCA para administrar localmente la mayor parte o todos los componentes necesarios para facilitar las condiciones óptimas de reparación del tejido óseo.

Otros agentes biológicamente activos que son administrados deseablemente a lugares óseos incluyen agentes anticancerosos, por ejemplo para el tratamiento de tumores óseos (ver, por ejemplo, Otsuka y col., J. Pharm. Sci. 84:733, 1995). El vehículo para administración de fármacos de la presente invención es particularmente útil, por ejemplo, cuando se ha extraído a un paciente quirúrgicamente un tumor óseo, ya que el material de PCA sintético de la presente invención puede mejorar la integridad mecánica del lugar óseo a la vez de tratar también las células cancerosas remanentes con el fin de evitar la metástasis. Ejemplos de agentes anticancerosos incluye, por ejemplo, metotrexato, cisplatino, prednisona, hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, dietilestilbestrol, propionato de testosterona, fluoximesterona, vinblastina, vincristina, vindesina, daunorrubicina, doxorubicina, hidroxixiurea, procarbazona, aminoglutetimida, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, mostaza de uracilo, clorambucilo, busulfán, carmustina, lomuslina, dacarbazina (DTIC: dimetiltriazenomidazol carboxamida), fluorouracilo, 5-fluorouracilo, citarabina, arabinósido de citosina, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, tioguanina.

Agentes biológicamente activos adicionales que pueden ser incorporados deseablemente al sistema de administración de fármacos de PCA sintético de la presente invención para administración a lugares óseos, son agentes que mitigan la osteoporosis. Por ejemplo, se ha demostrado que la calcitonina de salmón amidada es eficaz contra la osteoporosis.

La Vitamina D y la Vitamina K son también administradas deseablemente a lugares óseos, igual que factores angiogénicos tales como *veg-f*, que pueden ser utilizados cuando es deseable incrementar la vascularización.

Administración de Agentes Biológicamente Activos a Lugares de Implantes Subcutáneos:

Por supuesto, la aplicación del presente dispositivo para la administración de fármacos no se limita a lugares óseos. Se sabe que en lugares no óseos, el dispositivo se reabsorbe sin osificación.

La colocación del presente dispositivo de administración subcutáneamente es particularmente útil para la administración sistémica de compuestos biológicamente activos. La administración de estrógenos y/o progesteronas para ser utilizados en el control de la fertilidad es un ejemplo de una aplicación subcutánea. Adicionalmente, la administración de antígenos y/o vacunas puede ser realizada mediante implantación subcutánea.

Administración de Agentes Biológicamente Activos al Sistema Nervioso Central:

La administración de sustancias terapéuticas al sistema nervioso central puede ser llevada a cabo con los vehículos para administración de la invención. Sustancias terapéuticas útiles incluyen la administración de ácido γ -aminobutírico a focos epilépticos, la administración de L-dopa o de dopamina al estriado o a la sustancia nigra para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la administración de factores de crecimiento para prevenir la degeneración neural tal como GDNF en los ventrículos laterales, el estriado o la sustancia nigra para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la administración de NGF a la región cortical y a otras regiones para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o la administración de CNTF a la médula espinal sacra o lumbar para el tratamiento de la esclerosis amielolateral.

Administración de Agentes Biológicamente Activos a Otros Lugares:

Otros lugares de administración potenciales incluyen áreas intramusculares, intraperitoneales y oculares.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de Fosfato de Calcio Amorfo Reactivo

Este ejemplo describe la preparación etapa a etapa y los métodos para convertir sólidos de fosfato de calcio amorfo relativamente inerte en un fosfato de calcio amorfo altamente reactivo de la presente invención.

La Solución A se preparó a temperatura ambiente mediante la disolución rápida de 55 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sodio), 50 g de NaOH (hidróxido de sodio), 30 g de NaHCO_3 (bicarbonato de sodio) y 2 g de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ en 1,3 l de agua destilada. La Solución B fue preparada a temperatura ambiente mediante la disolución rápida de 43 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (nitrato de calcio tetrahidrato) y 1 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 0,5 l de agua destilada.

El fosfato de calcio amorfo carbonatado inerte fue preparado posteriormente a temperatura ambiente mediante la adición rápida de la Solución B a la Solución A agitada rápidamente. El precipitado de fosfato de calcio amorfo

ES 2 299 183 T3

similar a un gel así formado fue filtrado inmediatamente utilizando papel de filtro (0,05 m cuadrados) con velocidad media de filtrado y una presión de vacío de 10^{-2} torr aproximadamente. El material formaba una pasta poco espesa y fue lavado con 4 litros aproximadamente de agua destilada mediante la adición del agua al embudo de filtración. El material lavado fue recogido posteriormente utilizando una espátula y sumergido en nitrógeno líquido en un recipiente de 2,5 litros. Después de la formación de fragmentos congelados duros, el recipiente fue transferido a una cámara de vacío durante 24 horas (10^{-1} - 10^{-2} torr), hasta que se obtuvo un polvo fino y seco.

Aunque el procedimiento anteriormente descrito puede ser realizado a temperatura ambiente, el proceso completo tiene lugar preferiblemente por debajo de la temperatura ambiente ($4-5^{\circ}\text{C}$) con el fin de impedir además que el estado amorfo se convierta en una forma cristalina más estable. Además, pueden añadirse a la solución en cantidades traza elementos tales o iones que se sabe que actúan como inhibidores de la formación de hidroxiapatita cristalina.

Un espectro infrarrojo del material amorfo inerte en este punto del proceso contiene picos característicos de los grupos P-O (600 y 1000 cm^{-1}), del grupo CO_3^{2-} ($1.420-1.450\text{ cm}^{-1}$) con un pico relativamente grande del grupo O-H ($\sim 3.550\text{ cm}^{-1}$). El patrón de difracción de rayos X del mismo material muestra la naturaleza amorfa del material según se demuestra por la ausencia de picos pronunciados cuando se determina la medida de la cristalinidad tomando la proporción de los picos coherentes respecto al fondo.

El material amorfo inerte anteriormente descrito fue convertido posteriormente en una forma reactiva mediante calentamiento durante 60 minutos a 450°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). El IR del material calentado (no mostrado) muestra la reducción de grupos O-H y CO_3^{2-} particulares, indicando la reducción significativa de H_2O y CO_3^{2-} como CO_2 y H_2O . En muestras preparadas de forma similar se observó que el contenido de carbono disminuía un 60% aproximadamente, disminuyendo la proporción de carbonato total desde 1,56% a 0,5%. Observar, sin embargo, que la naturaleza amorfa del material no se perdió durante este proceso, según se demostró por el patrón de difracción de rayos X mostrado en la Figura 4(a). Se determinó que la medida de la proporción Ca/P de este material después del tratamiento con calor era de 1,575, utilizando un método de análisis cuantitativo con microsondas electrónicas (Figura 2). Las propiedades morfológicas y ultraestructurales globales del material amorfo están mostradas en la Figura 1, según se observan bajo un microscopio electrónico de transmisión. Observar el aspecto "amorfo" del material con ausencia de bordes definidos separando cada gránulo con cierta porción del material para presentar una forma amorfa (flechas). En este material se observó un área superficial específica extremadamente elevada de $120\text{ m}^2/\text{g}$, con un tamaño medio de poro de 130 \AA aproximadamente.

Ejemplo 2

Preparación de Fosfato de Calcio Amorfo Reactivo

La preparación se llevó a cabo según está descrito en el Ejemplo 1 anterior, con la excepción de que la preparación de las Soluciones A y B fue sustituida por las reacciones siguientes. La Solución A fue preparada a temperatura ambiente mediante la disolución rápida de 90,68 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 1,2 litros de H_2O destilada carbonatada. La Solución B fue preparada disolviendo 40,57 g de K_2HPO_4 en 1,53 litros de H_2O destilada que contenía 24 ml de una solución de KOH al 45% en volumen. Las propiedades químicas y físicas del producto fosfato de calcio amorfo resultante de este procedimiento fueron similares a las del material preparado según el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Preparación de Fosfato de Calcio Amorfo Reactivo

La preparación se llevó a cabo según está descrito en el Ejemplo 1 anterior, con la excepción de que la preparación de las Soluciones A y B fue sustituida por las reacciones siguientes. La Solución A fue preparada a temperatura ambiente mediante la disolución rápida de 10,58 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 0,15 litros de H_2O destilada carbonatada a un pH mayor de 9,0, ajustado con NaOH. La Solución B fue preparada disolviendo 7,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ en 0,35 litros de H_2O destilada. Las propiedades químicas y físicas del producto fosfato de calcio amorfo resultante de este procedimiento fueron similares a las del material preparado de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 4

Preparación de un Material Apatítico Débilmente Cristalino Sintético a Partir de Fosfato de Calcio Amorfo Reactivo

Este ejemplo describe la preparación del material de PCA de la invención.

El fosfato dicálcico dihidrato (DCPD) utilizado en este ejemplo fue preparado de la manera siguiente. La Solución A fue preparada a temperatura ambiente mediante la disolución rápida de 10 g de $\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ (hidrógeno fosfato de diamonio) en 500 ml de agua destilada a un pH de 4,6-4,8.

La Solución B fue preparada a temperatura ambiente mediante la disolución rápida de 17,1 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (nitrato de calcio tetrahidrato) en 250 ml de agua destilada. El fosfato dicálcico dihidrato fue preparado a temperatura ambiente mediante la adición rápida de la Solución B a la Solución A en agitación. Inmediatamente después, la muestra fue filtrada utilizando papel de filtro (0,05 m cuadrados) con una velocidad media de filtración y una presión de vacío

ES 2 299 183 T3

de 10^{-2} torr aproximadamente. El material formaba una pasta fina que fue lavada con 2 litros aproximadamente de agua destilada y secada posteriormente a temperatura ambiente durante 24-72 horas.

El material de fosfato de calcio amorfo reactivo preparado a partir del Ejemplo 1 fue mezclado en seco físicamente con fosfato dicálcico dihidrato ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 50:50% en peso utilizando un mortero y una mano de mortero durante 3-5 minutos. Posteriormente se añadió agua (1 ml/g de material mezclado) a la mezcla de polvos para producir una consistencia similar a una pasta. La cantidad de H_2O añadida variaba dependiendo de si se deseaba una pasta espesa o fina. El material pastoso fue posteriormente envuelto en papel de seda húmedo y fue endurecido para dar lugar a una masa sólida mediante calentamiento a 37°C . El proceso de endurecimiento podía ser retrasado durante varias horas envolviendo la muestra en parafilm y manteniéndola a 4°C . Además, puede dejarse que el endurecimiento tenga lugar a temperatura ambiente, aunque los tiempos de preparación pueden ser entonces prolongados.

El material endurecido estaba compuesto por fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino, de un tamaño de nanómetros, con una propiedad de solubilidad inherente que era superior a las solubilidades descritas para un material de hidroxiapatita sintético. Esto está demostrado en la Figura 3, en la que la concentración de iones de calcio liberados en una solución tampón de pH controlado durante 24 horas a 37°C , era significativamente más elevada para el material de PCA de la presente invención (curva 50) que para el material de hidroxiapatita cristalina estándar (curva 52).

Ejemplo 5

Preparación de un Material Débilmente Cristalino, Sintético, a Partir de Precursores con un Tamaño de Partícula Seleccionado

Este ejemplo demuestra la preparación de materiales de PCA sintéticos utilizando precursores con un tamaño de partícula seleccionado.

El DCPD fue preparado según se describió en el Ejemplo 4. El material seco fue triturado durante 5 minutos en un molino de laboratorio SPEX 8510 con una cámara de trituración de cerámica de alúmina SPEX 8505. Después de la trituración, el material fue tamizado de manera seriada a través de un agitador con un tamiz de ensayo Tyler para producir DCPD con 8 distribuciones de tamaño de grano diferentes según está indicado en la Tabla 1.

TABLA 1

Distribución del Tamaño de Grano del DCPD		
Muestra	Distribución del Tamaño del Grano	Grado de endurecimiento a los 30 minutos, 37°C
10-1	<25 μm	dura
10-2	25-35 μm	dura
10-3	35-53 μm	dura
10-4	53-63 μm	dura
10-5	distribución B3	dura
10-6	106-125 μm	no endurecida totalmente
10-7	distribución B2	no endurecida totalmente
10-8	distribución B1 sin tamizar	no endurecida totalmente

Se ha encontrado que la trituración preliminar del DCPD antes del tamizado puede ser sustituida por una breve trituración a mano utilizando un mortero y una mano de mortero sin cambiar sustancialmente los resultados.

El material de fosfato de calcio amorfo reactivo preparado a partir de los Ejemplos 1, 2 ó 3 fue mezclado en seco físicamente 1:1 (peso/peso) con DCPD durante 10 minutos utilizando un molino de laboratorio SPEX 8510 con una cámara de trituración de cerámica de alúmina SPEX 8505. Posteriormente se añadió agua (1,0-0,8 ml/g de mezcla seca) a la mezcla de polvos para dar lugar a una consistencia similar a una pasta. Cinco de las ocho muestras indicadas en la Tabla 1 se endurecieron bien en 30 minutos a 37°C . Las muestras 6, 7 y 8 no se endurecieron tan rápidamente o tan firmemente como las demás muestras. Cada una de estas muestras tenía porcentajes significativamente mayores de partículas $>100 \mu\text{m}$ que las demás muestras. De estas observaciones se concluyó que la utilización de DCPD de un tamaño de grano menor da lugar a un endurecimiento más rápido y completo que el obtenido con DCPD de tamaño de grano mayor.

Ejemplo 6

Preparación del Material de PCA Sintético a Partir de Fosfato de Calcio Amorfo Reactivo

5 El material de fosfato de calcio amorfo reactivo según se preparó en el Ejemplo 1 fue mezclado en seco con otros compuestos de fosfato de calcio, según el método descrito en el Ejemplo 4. Estos compuestos incluían, pero sin limitarse a: $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ (metafosfatos de calcio), $\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$ (decafosfato de heptacalcio), $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (pirofosfato de calcio), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (fosfatos tricálcicos). Se calculó apropiadamente que la proporción de la mezcla seca estaba entre proporciones de Ca/P de 1,5-1,70, dependiendo de la proporción molar de Ca/P del compuesto mezclado con el fosfato de calcio amorfo reactivo. El material resultante era un sólido de fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino con las mismas propiedades de solubilidad que las mostradas en la Figura 3.

Ejemplo 7

15 *Preparación de una Pasta Inyectable para la Formación de un Material de PCA Sintético a Partir de un Fosfato de Calcio Amorfo Reactivo*

Este ejemplo describe la preparación de una pasta inyectable para la formación de un sólido de fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino.

20 Los materiales mezclados en seco preparados de acuerdo con los Ejemplos 4 ó 6 fueron mezclados con H_2O destilada (2,3 ml/g). Se formó una pasta que podía ser modelada fácilmente a mano o inyectada a través de una boquilla tan pequeña como de 0,5 mm de DI. La fluidez aumentaba después de refrigerar la pasta a 4°C durante 2-3 horas.

25 El material podía ser almacenado en forma de pasta durante 12 horas aproximadamente a 4°C en un recipiente hermético sin endurecerse.

Ejemplo 8

30 *Características del Material de Fosfato de Calcio Apatítico Débilmente Cristalino Sintético*

El contenido cristalino del material de PCA fue determinado mediante difracción de rayos X y espectrometría IR.

35 Las Figs. 5a-d son los espectros de difracción de rayos X del producto de reacción entre el DCPD y el fosfato de calcio amorfo reactivo según se describió en el Ejemplo 4. La mezcla de reacción fue colocada en un entorno húmedo a 37°C y examinada mediante espectrometría de difracción de rayos X a diferentes tiempos. Las condiciones del barrido de rayos X fueron (a) ánodo de cobre, (b) $\lambda = 1,4540598 \text{ \AA}$ y (c) rango de barrido 20-35° en una etapa de 0,02° y un intervalo entre etapas de 2 segundos. La Figura 6 muestra el espectro infrarrojo del fosfato dicálcico dihidrato (a), del ACP activado de la invención (b) y del material de PCA de la presente invención (c).

40 Las muestras de las Figs. 5a-5d fueron incubadas durante 0, 20 minutos, 75 minutos y 5 horas, respectivamente. Las muestras fueron extraídas al tiempo indicado y liofilizadas para conservar las características químicas. La Fig. 5a, tomada al comienzo de la reacción, representa una combinación de picos atribuibles al ACP de partida y al difosfato dicálcico (ver la Fig. 4 para los patrones de DRX de los componentes). Se observan fácilmente picos pronunciados a 20,25°, 23,5°, 29,5°, 30,75° y 34,2° aproximadamente para el difosfato dicálcico cristalino. Al incrementar el tiempo de reacción, los picos cristalinos pronunciados tienden a desaparecer y aparecen picos anchos (amorfo) centrados a 26°, 28,5°, 32,0° y 33,0°. Es interesante observar que no hay un cambio significativo en el espectro después de 75 minutos de reacción, indicando que la reacción de conversión había finalizado esencialmente en poco más de una hora. El patrón de difracción de rayos X del material de PCA de la invención (Fig. 5d) puede ser comparado con el del hueso existente en la naturaleza, mostrado en la Fig. 7. Los dos espectros son casi idénticos, indicando la estrecha biomimesis del fosfato de calcio apatítico de la invención.

Ejemplos 9-12

55 *Características de la Pasta Inyectable para la Formación del Material de PCA Sintético a Partir de Fosfato de Calcio Amorfo Reactivo*

60 Estos ejemplos demuestran el efecto del volumen de fluido sobre la consistencia y la reactividad de la pasta inyectable para ser utilizada en la formación de un material de hidroxiapatita sintética débilmente cristalina. Cada una de las pastas fue preparada según se describió en el Ejemplo 7 anterior, y se determinaron la consistencia y la velocidad de reacción a temperatura ambiente y a 37°C. Las observaciones están descritas en la Tabla 2.

65

TABLA 2

5

Moldeabilidad, inyectabilidad y reactividad de un gramo de material de PCA para la administración de fármacos preparado con un volumen de agua variable

Ejemplo N°	Volumen de agua (ml)	Moldeabilidad	Inyectabilidad	Tiempo de endurecimiento (min) (4°C/TA/37°C)
9	0,7	- se desmenuza	-	-/-/-
10	0,8*	+++ pasta fácilmente modelada	+	>60/>60/30
11	0,9*	++ pasta dental	++	>60/>60/30
12	1,0	+ pasta dental líquida	+++	>60/>60/30

30

* Bajo ciertas circunstancias (por ejemplo, evaporación) estas muestras pueden secarse algo durante un periodo de una hora a temperatura ambiente. En tales casos, puede añadirse agua adicional con el fin de restaurar la consistencia original.

35

Ejemplo 13

Espectros Infrarrojos de los Materiales Precursores y Productos

Este ejemplo compara los espectros infrarrojos de los precursores cristalinos y amorfos producidos de acuerdo con los ejemplos y el material de PCA final producido mediante la reacción de precursores similares. La Fig. 7a presenta el espectro IR de la brusita (DCPD) preparada según se describió en el Ejemplo 4; la Fig. 7b presenta el espectro del ACP después del tratamiento con calor, preparado según se describió en el Ejemplo 1 y la Fig. 7c es el espectro IR del material de PCA preparado según se describió en el Ejemplo 4.

Ejemplo 14

Implantación y Reabsorción del Material de PCA en un Lugar Óseo

La finalidad de este estudio fue analizar la reabsorción y la osificación del fosfato de calcio PCA en un lugar de implante óseo. El método es también útil para analizar las propiedades de reabsorción y osificación de las formulaciones y compuestos ("composites") del fosfato de calcio PCA de la invención.

El artículo de ensayo utilizado fue una formulación de fosfato de calcio PCA preparada según se describió en el Ejemplo 4. El ACP y el DCPD fueron mezclados en las proporciones especificadas y triturados durante 1 minuto, 30 segundos en el equipo de trituración SPEX.

Conejos NZW machos adultos (>5 meses de edad), fueron mantenidos en cuarentena y aclimatados durante un mínimo de 10 días antes del inicio del estudio. Los animales fueron alojados individualmente en jaulas de acero inoxidable suspendidas. Bajo las jaulas se utilizó viruta en bandejas para la recogida de los excrementos. Antes del comienzo del estudio, los animales fueron asignados aleatoriamente a los grupos o tratamientos y fueron identificados mediante un tatuaje numerado en la oreja y por la tarjeta correspondiente en la jaula. Todos los animales tenían un único defecto localizado en una tibia. Los puntos de tiempo para las evaluaciones fueron 2, 4 y 8 semanas (2 animales por cada punto de tiempo). La cirugía se llevó a cabo bajo anestesia total y condiciones quirúrgicas asépticas.

ES 2 299 183 T3

Después de obtener la anestesia adecuada (por ejemplo, ketamina/xilacina), utilizando una técnica aséptica, se realizó una incisión sobre la tibia proximal lateral. El tejido blando fue retirado hacia un lado y se expuso el hueso. Utilizando un trépano de 5 mm aproximadamente en un torno manual dental a baja velocidad con irrigación (solución salina fisiológica al 0,9%) según fuera necesario, se cortó un orificio de ~5,5 mm de diámetro a través de la porción cortical del hueso. El disco óseo fue liberado de la corteza por disección y se preparó el lugar para el implante. El material precursor hidratado en forma de pasta fue colocado en el defecto. En los animales control los defectos se dejaron sin tratar. Los tejidos blandos fueron posteriormente cerrados en capas. Se preparó una muestra por animal utilizando este método.

Observaciones clínicas de la salud y bienestar general de los animales, con especial atención a sus capacidades ambulatorias, fueron llevadas a cabo al menos semanalmente. Todos los animales parecían tener buena salud. Al final del estudio los animales fueron sometidos a eutanasia con una sobredosis de anestésico y se recogió el lugar del implante. Se realizaron radiografías de las tibias a intervalos programados incluyendo después de la cirugía y en el momento de la necropsia.

Los lugares de implantación fueron fijados en formalina y teñidos con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson o con Von Kossa para muestras descalcificadas. Se prepararon también muestras histológicas sin descalcificar y se tiñeron con fucsina básica verde claro. Los cortes fueron evaluados microscópicamente por un patólogo veterinario certificado por el consejo (ACVP) con experiencia en patología de animales de laboratorio. Se realizaron observaciones subjetivas de la morfología ósea y se observó la presencia o ausencia de hueso organizado y de material de fosfato de calcio PCA detectable.

Los resultados histológicos indicaban cierta mineralización a las 2 semanas. Hacia las 4-6 semanas, los animales que habían recibido los implantes tenían un hueso trabecular normal en el lugar del implante sin evidencia de fosfato de calcio PCA restante. Los controles sin tratar no habían cicatrizado totalmente en cuanto a que no tenían un crecimiento completo y/o tenían un hueso de tipo no cortical. Las Figuras 10a y 10b son fotomicrografías de los defectos tibiales sin tratar y tratados, respectivamente, 2 semanas después de la cirugía. Como puede observarse, el hueso a la derecha del borde del defecto en la muestra no tratada (Fig. 9a) es hueso trabecular fino; el hueso nuevo a la derecha del borde del defecto en la muestra tratada es hueso trabecular denso.

Ejemplo 15

Implantación y Reabsorción del Material de PCA en un Lugar Subcutáneo

Este ejemplo demuestra la reabsorción del fosfato de calcio PCA de la invención cuando es implantado subcutáneamente en ratas. Demuestra también un procedimiento de selección útil para analizar las características de reabsorción de nuevas formulaciones de materiales y compuestos ("composites") para implantes biocerámicos.

Ochenta ratas Sprague-Dawley machos y ochenta hembras fueron implantadas cada una con 4 ml (2-4 g) del PCA de la invención (preparado de acuerdo con el Ejemplo 4) en el subcutis dorsal (>10 x la cantidad considerada máxima en humanos por kg). Los animales control fueron tratados con un volumen igual de solución salina. Los procedimientos de la operación están descritos en el Ejemplo 16. Las ratas fueron sacrificadas según el programa presentado a continuación en la Tabla 3. El lugar del implante fue examinado según se describe en el Ejemplo 16.

TABLA 3

Programa de Sacrificio	
Tiempo de sacrificio	Implante de fosfato de calcio PCA
1 semana	5 machos/5 hembras
2 semanas	5 machos/5 hembras
1 mes	5 machos/5 hembras
3 meses	5 machos/5 hembras
1 año	20 machos/20 hembras

Se recogió sangre para los análisis de patología clínica del seno retroorbital o mediante punción cardíaca (todos por el mismo método) mientras los animales estaban bajo anestesia con CO₂. Se recogieron muestras de sangre de cada grupo de animales antes del sacrificio programado. Se llevaron a cabo observaciones clínicas de los animales para determinar la salud y el bienestar general al menos semanalmente hasta 3 meses, y posteriormente una vez al mes.

ES 2 299 183 T3

En la semana 1, estaba presente material de PCA en el lugar del implante y se encontró asociado con granulomas que iban de moderados a manifiestos asociados presumiblemente con el proceso de reabsorción. En la semana dos, una pequeña cantidad de material de PCA estaba todavía presente en el lugar del implante y los granulomas asociados eran de leves a moderados. Hacia la semana cuatro, la mayor parte del tejido parecía normal, persistiendo unos cuantos granulomas leves en el lugar del implante. En la semana doce, no quedaba ninguna evidencia del implante.

Ejemplo 16

Implantación y Reabsorción del Material de PCA en un Lugar Intramuscular

Este ejemplo describe la preparación de implantes de material de PCA que tienen tiempos variables de reabsorción *in vivo* como resultado de una variedad de tiempos de trituración. Los precursores secos individuales, ACP y DCPD, fueron preparados según se describió en el Ejemplo 4. Posteriormente se prepararon varias formulaciones diferentes de DCPD y ACP mediante i) la trituración del DCPD durante 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2,5 minutos o 5 minutos en un triturador SPEX; ii) la combinación del DCPD triturado con ACP 1:1; y iii) la trituración de la mezcla durante 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2,5 minutos o 5 minutos adicionales, respectivamente. Los tiempos de trituración totales para las diferentes preparaciones fueron por tanto 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos y 10 minutos.

El fosfato de calcio PCA, esterilizado en forma de polvo mediante 2,5 Mrad aproximadamente de irradiación gamma, fue preparado según se describió en el Ejemplo 4 tomando el material en forma de polvo y mezclándolo con agua o solución salina estéril y moldeándolo en discos de 1 cm aproximadamente de 2 mm de espesor e incubándolos durante un mínimo de 30 minutos a 37°C. Los discos fueron implantados en conejos New Zealand White adultos machos inmediatamente después de la fabricación.

Los animales fueron asignados a grupos de dosis que contenían 3 machos para un total de 15 animales. Los implantes fueron asignados a los conejos aleatoriamente. Diez-quince minutos antes de la cirugía, el animal fue premedicado con xilacina (10 mg/kg, i.m.). Posteriormente se administró al animal ketamina (50 mg/kg, i.m.). La superficie dorsal del animal fue afeitada y lavada con una solución quirúrgica de betadine y alcohol. Antes de la cirugía el animal fue monitorizado para asegurarse de que estaba anestesiado adecuadamente. Para hacer esto, se aplicó presión a la almohadilla subplantar. Si no había respuesta, el animal estaba anestesiado correctamente. A lo largo del procedimiento, el animal fue monitorizado para observar si se producía contracción de los bigotes y si tenía reflejo en los dedos de las patas cuando eran pellizcados, lo cual indicaba que el animal no se estaba despertando.

Utilizando una técnica aséptica y una hoja de bisturí, se realizó una incisión de 1-2 cm de longitud en la piel sobre el músculo *longissimus lumborum* (que está a lo largo de ambos lados de la columna vertebral). Cuando se realizó la incisión, la fascia subyacente y el músculo fueron también cortados para permitir que la muestra pasara al músculo. El disco de muestra fue colocado directamente en el músculo, asegurándose de que el implante completo era incrustado en el músculo. El músculo fue cerrado con una única sutura absorbible y la piel se cerró subcutáneamente mediante puntos. Se utilizaron agrafes para piel de metal para cerrar la incisión de la superficie externa de la piel. De esta manera se colocaron en cada lado cinco muestras. Cada muestra fue colocada en el extremo de la incisión y estaban separadas 1 cm aproximadamente entre sí (ver el diagrama). Las muestras estaban en forma de discos de 7 mm por 2 mm que pesaban 150 mg aproximadamente. Los animales fueron monitorizados y recibieron buprenorfina (0,02-0,05 mg/kg, s.c.) después de despertarse. El analgésico fue administrado 2 veces al día durante 3 días después de la cirugía.

Los animales fueron radiografiados inmediatamente después de la cirugía y posteriormente cada dos semanas. Las radiografías fueron comparadas para seguir la reabsorción de los materiales. Se utilizó un método estandarizado para las radiografías con el fin de minimizar cualquier variación entre los puntos de tiempo.

Después de la eutanasia, los lugares del implante fueron evaluados primeramente mediante examen macroscópico. En los sitios con implantes visibles, los implantes aparecían como discos sólidos de color gris a amarillo. En los lugares en los que se había reabsorbido el implante, se observaron áreas de decoloración del músculo de color rojo a marrón.

El tejido muscular, con los implantes, fue extraído, teniendo cuidado de no alterar los implantes. Los tejidos y las marcas identificativas fueron colocados en recipientes marcados llenos de formalina tamponada neutra al 10%. Todos los lugares de implante fueron procesados y evaluados microscópicamente. Las observaciones incluían fibrosis focal, inflamación glanulomatosa focal y aspecto del implante (en algunos casos). La fibrosis fue observada principalmente como fibrocitos y colágeno. Los animales con reabsorción aparente tenían fibrosis e inflamación focal granulomatosa de mínima a moderada. La inflamación granulomatosa fue observada como agregados focales de macrófagos y células gigantes, a menudo con cristales intracitoplásmicos, y heterófilos y linfocitos ocasionales. La inflamación alrededor de los implantes no reabsorbidos era principalmente fibrosis de mínima a leve y/o inflamación granulomatosa, ambas de las cuales estaban dentro del rango aceptable para los implantes intramusculares.

A las cuatro semanas, las pastillas de los implantes de fosfato de calcio PCA que habían sido preparadas por trituración durante 30 segundos, 1 minuto o 2 minutos se habían reabsorbido totalmente. Las que habían sido preparadas triturando durante 5 minutos o 10 minutos no se habían reabsorbido totalmente.

Ejemplo 17

Implantación y Reabsorción del Material de PCA en un Lugar Óseo

5 La finalidad de este estudio era analizar la reabsorción y la osificación del fosfato de calcio PCA de la invención en un lugar óseo.

10 Para este estudio se emplearon perros beagle maduros (>1 año) debido a su tamaño y al uso histórico como modelo para estudios de hueso. La tibia del perro es suficientemente grande para permitir la creación y el estudio de defectos grandes (> 5 mm) sin comprometer la capacidad del animal para moverse y sin inducir fracturas secundarias a la inducción de defectos en los huesos.

15 Diez perros beagle adultos machos y hembras (6,0-15,0 kg) recibieron el mismo tratamiento. Se crearon defectos en la superficie lateral de la corteza de la cresta de la tibia (8 mm o 10 mm) en cada tibia. El fosfato de calcio PCA fue colocado en el defecto de una tibia y la otra tibia sirvió como control.

20 Se realizó una incisión sobre la tibia proximal. El tejido blando fue retirado hacia un lado y el hueso expuesto. Utilizando un trépano de 8 mm en un torno manual dental a baja velocidad con irrigación (solución salina fisiológica al 0,9%) cuando era necesario, el disco óseo fue liberado por disección y se preparó el lugar para el implante. El material de fosfato de calcio de la invención (sólido o pasta) fue colocado en el defecto. Los tejidos blandos fueron posteriormente cerrados en capas. Se realizaron de una a tres muestras por animal utilizando este método. Se dejó que los animales cicatrizaran durante periodos de tiempo programados.

25 Los animales fueron evaluados mediante observaciones clínicas, radiografías y microscopía de los lugares con defecto a las 0, 2, 4 y 8 semanas. Específicamente, se realizaron radiografías de la tibia cada 2 semanas a lo largo del estudio. Las radiografías fueron utilizadas para determinar la duración del estudio. Aproximadamente al final de cada 2 semanas, se sacrificaron 2 animales y los lugares de ensayo fueron extraídos para histología. Los lugares de implantación fueron preparados como secciones descalcificadas y sin descalcificar.

30 Se utilizaron 2 perros como animales piloto y no recibieron el material de PCA. En estos animales piloto, se observó cierta cicatrización radiográficamente a las 2 semanas. Hacia las 6-8 semanas, el defecto había cicatrizado completamente. Se determinó que el tamaño de los defectos de los perros era óptimo a 1 cm. En los 8 perros restantes, los defectos control cicatrizaron en 6 semanas; los defectos tratados cicatrizaron en 2 a 4 semanas. La calidad del hueso en los defectos control era hueso trabecular fino; en los defectos tratados, el hueso era hueso de tipo trabecular denso a cortical. Por tanto, los defectos tratados cicatrizaban 2 semanas aproximadamente más rápido que los defectos sin tratar, y cicatrizaban con una mejor densidad ósea.

35 La Figura 11 muestra una fotografía muy aumentada (10x) del crecimiento de hueso trabecular canino en el lugar de un defecto tratado con el material de PCA de la invención 8 semanas después de la cirugía. Las flechas pequeñas indican células similares a osteoblastos que tapizan las espículas óseas y son indicativas de una actividad celular incrementada.

40 La Figura 12 muestra una fotomicrografía de un defecto óseo cortical canino tratado con el material de PCA de la invención. Las flechas grandes indican un borde del defecto. El crecimiento de hueso nuevo está a la derecha del defecto; 4 semanas después de la cirugía, este crecimiento es hueso trabecular denso.

Ejemplo 18

Implantación y Reabsorción de un Implante de Material de PCA en un Lugar Óseo

50 La finalidad de este estudio era analizar la reabsorción y la osificación del fosfato de calcio PCA de la invención, y establecer parámetros para la selección de materiales de fosfato de calcio PCA de ensayo.

55 En estos estudios se utilizaron 18 conejos NZW machos adultos (>3 meses de edad). Después de obtener la anestesia adecuada (por ejemplo, ketamina/xilacina para producirla), utilizando una técnica aséptica, se realizó una incisión sobre la tibia proximal. El tejido blando fue retirado hacia un lado y se expuso el hueso. Utilizando un trépano de 5 mm aproximadamente en un torno manual dental a baja velocidad con irrigación (solución salina fisiológica al 0,9%) cuando era necesario, el disco óseo fue liberado por disección y el lugar fue preparado para el implante. El material de fosfato de calcio PCA de la invención (sólido, gránulos o pasta) fue colocado en el defecto. Los tejidos blandos fueron posteriormente cerrados en capas.

60 Observaciones clínicas de la salud general y del bienestar de los animales, con especial atención al movimiento, se llevaron a cabo semanalmente y con más detalle en el momento de las radiografías bisemanales. Se realizaron radiografías de las tibias a intervalos programados, incluyendo después de la cirugía y en el momento de la necropsia.

65 Los lugares de implantación fueron preparados como muestras descalcificadas teñidas con hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson y como cortes sin descalcificar.

Los hallazgos y las observaciones clínicas estaban asociados con la cirugía y no estaban asociados con los implantes de fosfato de calcio PCA. Las observaciones clínicas posteriores a la cirugía estaban dentro del rango de los hallazgos previstos para el trauma relacionado con la cirugía. Se realizaron radiografías inmediatamente después de la cirugía y a cada punto de tiempo de sacrificio programado.

Inmediatamente después de la cirugía, todos los lugares de los defectos óseos eran claros; los implantes parecían tener la misma radiodensidad que el hueso. Dos semanas después de la cirugía, los defectos del control tenían lugares claros y los lugares del implante eran menos claros y se iban fundiendo con el hueso circundante; se observaron hallazgos similares a las 4 semanas. A las 7 semanas, todos los lugares parecían similares, con una radiodensidad incrementada. Macroscópicamente, los lugares del defecto a las 2 semanas eran claramente visibles en los animales control y en los animales tratados. A las 4 semanas y después, los lugares del implante o los lugares control no podían ser determinados macroscópicamente.

Los hallazgos radiográficos indicaban poco cambio en los animales control hasta la semana 7; los animales tratados con el material de PCA de la invención tenían una radiodensidad creciente en el defecto a lo largo del tiempo. Los defectos de los animales control presentaban cierto crecimiento de hueso nuevo, predominantemente del tipo trabecular fino, en 4-7 semanas. Los defectos de los animales tratados presentaban crecimiento óseo tan pronto como a las 2 semanas, y hacia las 7 semanas estaban rellenos de hueso nuevo. Los hallazgos microscópicos son consistentes con una sustitución ósea incrementada por los implantes de fosfato de calcio PCA. Tomado en conjunto, este estudio muestra que defectos de 5 mm en la tibia del conejo cicatrizan o tienen crecimiento de hueso nuevo en los animales control hacia las 7 semanas y en los animales tratados con el material de PCA de la invención hacia las 4 semanas. Además, este modelo del defecto de tamaño crítico de 5 mm unicortical en conejo es útil para analizar productos de ensayo con el fin de determinar sus propiedades de reabsorción y osificación.

La Figura 13 muestra fotomicrografías de defectos tibiales de conejo sin tratar (Fig. 13a) y tratados (13b) 4 semanas después de la cirugía. La flecha grande indica el borde del defecto. En la Fig. 13a, las flechas pequeñas 100 indican la abundancia de tejido conectivo fibroso en el lugar del defecto. La cabeza de flecha grande 102 señala hueso trabecular nuevo en el defecto. En la Fig. 13b, las dos flechas pequeñas 104 demarcan el crecimiento de hueso trabecular denso en el lugar del defecto.

Ejemplo 19

Variación de las Velocidades de Reabsorción de los Materiales de PCA Sintéticos al Variar el Tamaño de Partícula

El material precursor del PCA es preparado según el Ejemplo 5. Se preparan dos mezclas de precursores, la muestra A que corresponde a la muestra 6 y la muestra B se corresponde a una mezcla 2:4:3:1 de las muestras 1, 2, 3 y 4. Pastas de precursores hidratados de las dos muestras son analizadas en roedores en el ensayo subcutáneo del Ejemplo 15. La reabsorción es monitorizada a varios puntos de tiempo.

Ejemplo 20

Incorporación de un Agente Biológicamente Activo a un Dispositivo de Material de PCA y Conservación de la Estabilidad In Vitro

Este ejemplo demuestra la incorporación de una proteína a un vehículo de administración de la presente invención de una forma que se conserva la estabilidad *in vitro* de la proteína.

Se prepara tripsina pancreática bovina en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de 100 mg/ml. Se añaden 0,8 ml de esta solución a 1 g de una mezcla 1:1 de ACP activado y DCPD según se describió en el Ejemplo 17, muestra B. La mezcla se modela en forma de una bola y se endurece en un entorno húmedo a 37°C durante 30 minutos. La bola endurecida es posteriormente liofilizada durante una noche y posteriormente es triturada mediante y con un mortero y una mano de mortero. El polvo formado de esta forma es mezclado con 1 ml de agua y aplicado a los pocillos de una placa de ensayo con caseína. El aclaramiento de la caseína turbia en un anillo alrededor del pocillo es comparada con el aclaramiento observado en un pocillo cargado de manera similar con una muestra de PCA liofilizado conteniendo tripsina inactivada por calor.

Ejemplo 21

Incorporación de un Agente Biológicamente Activo a un Dispositivo de Material de PCA y Conservación de la Estabilidad In Vivo

Este ejemplo demuestra la incorporación de una proteína a un vehículo de administración de la presente invención de una forma que se conserva la actividad *in vivo* de la proteína.

Se preparan 200 mg/ml de beta-galactosidasa (Worthington LS004093) en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,0. Se añaden 0,8 ml de esta solución a 1 g de una mezcla 1:1 de ACP activado y DCPD (preparada según se describió en el Ejemplo 17, muestra B) y se mezcla para dar lugar a una masilla. El PCA modelable es posteriormente preparado en forma de bola e implantado subcutáneamente en una rata. Dos semanas después se extrae la bola de PCA,

ES 2 299 183 T3

se liofiliza y se tritura con un mortero y una mano de mortero. El polvo es posteriormente analizado para determinar la actividad beta-galactosidasa, utilizando por ejemplo un ensayo líquido tal como el descrito por Miller (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972).

5 Ejemplo 22

Administración de un Antibiótico

Este ejemplo demuestra la utilización del vehículo de administración para administrar un antibiótico en una aplicación dental.

Se preparan 100 mg/ml de gentamicina en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,0. Se añaden 0,8 ml de esta solución a 1 g de una mezcla 1:1 de ACP activado y DCPD (preparada según se describió en el Ejemplo 17, muestra B) y se mezcla para dar lugar a una masilla. El PCA modelable es preparado posteriormente en forma de bola e implantado subcutáneamente en una rata. Dos semanas después la bola de PCA es extraída, liofilizada y triturada con un mortero y una mano de mortero. El polvo es posteriormente analizado para determinar la actividad bactericida utilizando un ensayo de zonas de inhibición bactericidas/bacteriostáticas de la USP.

20 Ejemplo 23

Administración de una Vacuna

Este ejemplo demuestra la utilización del vehículo de administración de la presente invención para administrar una vacuna.

Se prepara hemocianina de la lapa ojo de cerradura a una concentración de 0,5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,0. Se añaden 0,8 ml de esta solución a 1 g de una mezcla 1:1 de ACP activado y DCPD (preparada según se describió en el Ejemplo 17, muestra B) y se mezcla para dar lugar a una masilla. El PCA modelable es preparado posteriormente en forma de bola e implantado subcutáneamente en una rata. El proceso es repetido una vez al mes durante 4 meses. Se extraen muestras de sangre regularmente y se determinan los títulos de anticuerpo anti-hemocianina de la lapa ojo de cerradura mediante ELISA.

Ejemplo 24

Administración de un Ácido Nucleico

Este ejemplo demuestra la utilización del vehículo de administración de la presente invención para la administración intramuscular de un ácido nucleico con la finalidad de transfección celular. Este método puede ser también utilizado para incorporar ADN a tejidos distintos del músculo.

Se prepara ADN del plásmido pUC 19 en EDTA TRIS pH 7,4 a 2 mg/ml. Se añaden 0,8 ml de esta solución a 1 g de una mezcla 1:1 de ACP activado y DCPD (preparada según se describió en el Ejemplo 17, muestra B) y se mezcla para dar lugar a una masilla. El PCA modelable es posteriormente preparado en forma de bola e implantado intramuscularmente en una rata. Después de 4 semanas, el músculo del lugar del implante es disecado y teñido histológicamente para determinar la presencia del producto del gen de la B galactosidasa.

Ejemplo 25

Implantación y Reabsorción de un Dispositivo de Material de PCA para el Tratamiento de la Enfermedad de Parkinson

Este ejemplo demuestra la utilización del vehículo de administración de la presente invención con el fin de administrar un fármaco para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Se convirtieron primates en hemiparkinsonianos con MPTP y se evaluaron comportamentalmente según está descrito en Kordower y col., Cell Transplantation 14:155-171, 1995.

Se preparan 200 mg/ml de GDNF en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,0. Se añaden 0,8 ml de esta solución a 1 g de una mezcla 1:1 de ACP activado y DCPD (preparada según se describió en el Ejemplo 17, muestra B) y se mezcla para dar lugar a una masilla. El precursor de PCA hidrato es posteriormente modelado en 3 cilindros de 1 mm x 1 cm aproximadamente cada uno y endurecido en un entorno húmedo a 37°C.

Los cilindros son posteriormente colocados en los ventrículos laterales del lado lesionado de los animales experimentales y se continúa la evaluación comportamental de los primates. Después de dos meses, los animales son sacrificados y se analizan las neuronas de la sustancia negra y del estriado para determinar la actividad tirosina hidroxilasa.

Ejemplo 26

Implante Pre-endurecido: Aumento y Reabsorción en el Modelo de Inserción Mandibular Canino

5 El fin de este estudio era evaluar la reabsorción, la osificación y la biocompatibilidad de dos formulaciones del fosfato de calcio PCA de la invención en lugares mandibulares caninos. El fosfato de calcio PCA pre-endurecido fue implantado en un modelo de inserción mandibular canino que puede ser utilizado adicionalmente como modelo de aumento.

10 El producto de ensayo era fosfato de calcio PCA en dos formulaciones, correspondientes a los Tipos 2 y 10 descritos en el Ejemplo 16. El fosfato de calcio PCA fue pre-endurecido en un entorno húmedo a 40°C aproximadamente inmediatamente antes del implante. Los implantes control eran cilindros de 3 mm x 4 mm de silicona e hidroxiapatita porosa, respectivamente.

15 Dos perros adultos de tipo sabueso hembras (20 a 25 kg) fueron utilizados en el estudio. Ambos perros recibieron dos implantes control (uno de cada) en el lado derecho de la mandíbula y una de cada una de las formulaciones de fosfato de calcio PCA de Tipo 2 y de Tipo 10 en el lado izquierdo (opuesto).

20 La implantación se llevó a cabo bajo anestesia total y condiciones quirúrgicas asépticas. Los animales fueron pre-medicados con tranquilizantes y con agentes del tipo atropina e inducidos con barbitúricos. Los signos vitales de los animales (temperatura, ritmo cardíaco, ritmo respiratorio) fueron monitorizados antes y a lo largo de todo el procedimiento. Los animales fueron analizados para determinar la profundidad anestésica apropiada mediante pellizcamiento de los dedos de las patas y mediante estimulación corneal. Después de obtener la anestesia adecuada, utilizando una técnica aséptica, se realizó una incisión en la piel sobre la superficie ventral lateral media de la mandíbula y el cuello proximal (sobre el borde inferior de la mandíbula). El tejido blando fue retirado hacia un lado y se expuso el hueso. Se elevó el periostio sobre la superficie mandibular externa y la superficie del hueso fue desbastada con una fresa o un torno hasta que se convirtió en rugosa y sangrienta con una forma adecuada para aceptar los implantes cilíndricos. Los artículos control y el fosfato de calcio PCA pre-endurecido fueron colocados en los defectos. Dos muestras por animal por lado fueron colocadas en cada superficie mandibular externa utilizando este método (dos muestras de fosfato de calcio PCA experimentales y dos controles). Las muestras fueron colocadas a 1 cm aproximadamente para asegurar que no hubiera yuxtaposición entre ellas. El periostio fue cerrado en primer lugar utilizando vicrilo 3-0. Los tejidos blandos fueron posteriormente cerrados en capas con sutura absorbible de vicrilo 3-0. La piel fue cerrada con suturas interrumpidas simples de nailon 5-0. Se dejó cicatrizar a los animales durante periodos de tiempo programados. Un perro fue sacrificado a las 3 semanas y el otro a los 3 meses y los lugares de ensayo se extrajeron para histología.

35 Todos los animales fueron sacrificados y se recogieron las marcas identificativas.

Los sitios de implantación fueron preparados como secciones sin descalcificar. Las secciones fueron evaluadas para determinar la biointegración, la biodegradación y la biocompatibilidad.

40 Los resultados fueron según sigue: Se observó una biocompatibilidad excelente en todos los puntos de tiempo. No se observaron células gigantes y se observó un número mínimo de macrófagos. Hubo únicamente una capa de reacción mínima de sólo unas cuantas células de espesor en la base de los implantes de fosfato de calcio PCA. Esto es significativamente mejor que lo observado en los controles.

45 A las tres semanas, la mayor parte del material de Tipo 2 se había reabsorbido. A las doce semanas, el Tipo 2 se había reabsorbido completamente en la superficie del hueso original. Adicionalmente, el hueso del receptáculo no estaba totalmente diferenciado.

50 Las muestras de Tipo 10 demostraron integración ósea con el crecimiento de hueso nuevo y migración celular al implante. El propio implante se había reabsorbido un 10% después de doce semanas.

55 El implante control de silicona, que no es reabsorbible, mostraba una reacción de cuerpo extraño de leve a moderada. Los huecos no se habían rellenado a las tres semanas, pero hacia las doce semanas estaban llenos de tejido fibroso. El implante control de hidroxiapatita no mostró signos de reabsorción ni de integración ósea en las primeras doce semanas.

60 Este experimento confirma la excelente biocompatibilidad del fosfato de calcio PCA de la invención. Adicionalmente, se observó una diferencia en el tiempo de reabsorción entre las dos formulaciones de PCA, con un curso temporal de reabsorción prolongado para la muestra en la cual los precursores fueron mezclados/triturados durante un periodo de tiempo mayor (Tipo B).

65 Los resultados señalan también las propiedades de reabsorción y osificación más lentas observadas en el lugar del implante mandibular sin carga en comparación con las aplicaciones que llevaban carga y que osificaban rápidamente de los Ejemplos 14, 17 y 18.

ES 2 299 183 T3

Ejemplo 33

Aumento In Vivo con un Compuesto (“Composite”) de PCA/HA

5 Este ejemplo demuestra la utilización de un material de PCA que se reabsorbe de manera relativamente lenta en un “composite” de PCA/HA para producir un aumento esquelético de larga duración, que conserva la forma.

10 Los “composites” de PCA/HA son preparados mezclando HA particulada (tamaño de grano $<200\ \mu\text{m}$) con la masilla precursora hidratada de la invención descrita en el Ejemplo 5, Muestra 5, en una proporción que varía del 0,05 al 30% peso/volumen. La masilla granular producida por esta mezcla es modelada en una forma adecuada para el implante. La masilla granular es posteriormente endurecida a 37°C .

15 El lugar del implante es preparado eliminando por disección unos cuantos milímetros del hueso cortical, incluyendo el periostio. Si es posible, el periostio es desprendido de la superficie ósea cortical en el lugar del implante, pero se deja unido. El material y la sangre del hueso disecado son retenidos y mezclados con la pasta de material de PCA fresca (esto es, el precursor hidratado) en una proporción 1:3 volumen/volumen aproximadamente, y se deja aparte. Se utiliza pasta del material de PCA fresca como cemento para fijar el implante a la superficie ósea cortical expuesta. Se aplica pasta del material de PCA adicional según sea necesario para asegurar la adhesión del implante. La mezcla de PCA/material tisular retenida es utilizada posteriormente como fuente de siembra para el implante y es aplicada a tanta superficie del implante como sea posible. El periostio es posteriormente colocado de nuevo sobre el implante tanto como sea posible.

Ejemplo 34

Producción de Fosfato de Calcio PCA Utilizando un ACP y Promotores Participantes

25 Este ejemplo demuestra las propiedades de endurecimiento y la formación de fosfato de calcio PCA a partir de ACP utilizando varios promotores participantes diferentes. Se preparó ACP altamente reactivo de acuerdo con el Ejemplo 1.

30 La hidroxiapatita nanocristalina de las muestras 1-1, 1-2 y 1-3 fue preparada sin inhibidores de la cristalización según sigue: 218 g de ortofosfato hidrógeno disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) fueron disueltos en 1200 ml de solución de agua destilada. Para el fosfato de calcio PCA carbonatado de las muestras 1-1 y 1-2, se añadieron también a esta solución 80 g de NaHCO_3 . Se disolvieron 70 g de nitrato de calcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] en 500 ml de agua destilada. La solución de calcio fue vertida rápidamente en la solución de fosfato a temperatura ambiente con agitación constante. La precipitación fue inmediata y sustancialmente completa. El pH del precipitado fue ajustado a 7,4 por la adición de una solución de hidróxido de sodio con el fin de evitar la formación de fosfatos de calcio ácidos. El precipitado fue separado inmediatamente de la solución por filtración a través de un filtro Buchner (con una superficie total de 0,1 m cuadrados aproximadamente) y fue lavado con 3 litros aproximadamente de agua destilada. Sobre el papel de filtro se obtuvo una masa de gel de fosfato de calcio de baja cristalinidad. Una porción de la masa de gel fue liofilizada inmediatamente para las muestras 1-2 y 1-3.

45 Para la muestra 1-1, la masa de gel fue tratada según sigue: Después de la filtración y el lavado, se añadió al gel precipitado una cantidad apropiada de agua destilada (del 5 al 80% en peso). El gel fue homogeneizado batiéndolo enérgicamente durante unos cuantos minutos. Posteriormente fue colocado en moldes de politetrafluoroetileno (PTFE) (60 mm de diámetro; 2 mm de altura) y sonicado durante unos minutos con el fin de liberar las burbujas de aire atrapadas en el gel.

50 Los moldes fueron secados en una cámara a temperatura (5 a 37°C) y humedad (del 10 al 95% HR) controladas. Las muestras se contraían lentamente a medida que se iban secando y liberaron la mayor parte de su agua. El nivel de secado y de reducción de las muestras dependía del contenido inicial de agua. El material se endureció al secarse y se convirtió en vítreo. Contenía un 10% aproximadamente de agua residual.

55 Las restantes hidroxiapatitas y fuentes de calcio fueron utilizadas como tales a partir de fuentes comerciales.

60

65

TABLA 4

Conversión del ACP Utilizando Promotores Participantes					
Muestra	Promotor participante	Incubación a 37°C	Grado de endurecimiento	PCA por FTIR*	PCA por DRX*
1-1	Hidroxiapatita nanocristalina carbonatada, secada al aire	30 minutos 2 horas	Comenzaba a endurecerse Dura	si	NR
1-2	Hidroxiapatita nanocristalina carbonatada, liofilizada	30 minutos 2 horas	Dura Dura	si	Si
1-3	Hidroxiapatita nanocristalina no carbonatada, liofilizada	30 minutos 2 horas	Comenzaba a endurecerse Dura	si	NR
1-4	Hidroxiapatita de Aldrich Tamaño de grano >15-30 µm	30 minutos	Dura	si	Si
1-5	Hidroxiapatita de Clarkson Tamaño de grano >250 µm	30 minutos	Comenzaba a endurecerse	si	NR
1-6	Monetita no calcinada Tamaño de grano	30 minutos 15 horas	Blanda Comenzaba a endurecerse	si	NR
1-7	CaCO ₃	30 minutos 15 horas	Comenzaba a endurecerse	si	NR
1-8	Ca(OH) ₂	30 minutos 15 horas	Blanda Comenzaba a endurecerse	si y Ca(OH) ₂	NR
1-9	Ca(CH ₃ COO) ₂	30 minutos 15 horas	Blanda Blanda	si	NR
*PCA = fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino NR = análisis no realizado					

El ACP fue mezclado con el promotor específico en una proporción (peso/peso) de 50:50 aproximadamente (ver la Tabla 1) durante 5 minutos en un molino de laboratorio SPEX. Se añadieron 0,8 ml aproximadamente de H₂O/g de polvos secos a la mezcla del precursor seco y se mezcló para formar una pasta. La mezcla fue posteriormente moldeada en forma de bola, envuelta en papel de seda húmedo y calentada a 37°C durante al menos 30 minutos. Después de 30 minutos y a varios puntos de tiempo posteriormente, la pasta fue monitorizada para determinar su dureza. Las Figuras 15 y 16 son DRX representativos de las reacciones 1-2 y 1-4. La utilización de dos hidroxiapatitas con tamaño de grano diferente como promotores participantes dio lugar a resultados similares a los obtenidos con DCPDs de tamaño de grano diferente (ver Ejemplo 5). Esto es, la hidroxiapatita de tamaño de grano mayor endurecía más lentamente y menos completamente que la hidroxiapatita de grano más pequeño.

ES 2 299 183 T3

Ejemplo 35

Utilización de un Promotor de Fosfato de Calcio Apatítico Neutro

5 Este ejemplo demuestra la utilización de fosfato de calcio apatítico neutro como promotor de la conversión de ACP en el fosfato de calcio PCA de la invención con el fin de estimular el crecimiento óseo *in vivo*. Hidroxiapatita estequiométrica es mezclada con ACP reactivo según se describió en el Ejemplo 34-37. La pasta del precursor hidratado es aplicada a sujetos animales según se describió en los Ejemplos 14, 15 ó 16. La cicatrización del hueso y la biocompatibilidad fueron monitorizadas según se describió en los puntos de tiempo indicados.

10

Ejemplo 36

Producción del Material de PCA Utilizando Promotores

15 Este ejemplo demuestra la producción de fosfato de calcio PCA a partir de ACP utilizando varios promotores pasivos diferentes.

Se preparó ACP altamente reactivo de acuerdo con el Ejemplo 5. El ACP fue mezclado con el promotor específico en una proporción (peso/peso) de 5:1 ó 1:1 aproximadamente (ver la Tabla 2) durante 5 minutos en un molino de laboratorio SPEX. Se añadió agua (0,75-0,85 ml) y se mezcló hasta formar una masilla. La mezcla fue posteriormente moldeada en forma de bola, envuelta en papel de seda húmedo y calentada a 37°C durante al menos 30 minutos. Después de 30 minutos y a varios puntos de tiempo posteriores la pasta fue monitorizada para determinar su dureza. La Figura 17 es un DRX representativo de la muestra 2-4 empleando un promotor de alúmina. En esta figura pueden verse los picos de la alúmina superpuestos al perfil del fosfato de calcio PCA estándar.

25

TABLA 5

Conversión del ACP Utilizando Promotores Pasivos					
Estudio #	Promotor Pasivo (ACP:Promotor)	Tiempo de Incubación a 37°C	Grado de endurecimiento	PCA por FTIR*	PCA por DRX*
2-1	SiO ₂ (5:1)	30 minutos 3 horas	Blando Muy duro	si	si
2-2	Mica (5:1)	30 minutos 12 horas	Blando Muy duro	si	si
2-3	Al ₂ O ₃ (1:1)	30 minutos 12 horas	Blando Muy duro	si	si
2-4	Al ₂ O ₃ (5:1)	30 minutos 12 horas	Blando Muy duro	si	si

*PCA = fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino

Ejemplo 37

55

Perfil de la Reacción

Este ejemplo demuestra la utilización de un calorímetro diferencial de barrido (DSC) para monitorizar la sensibilidad a la temperatura y la naturaleza endotérmica neta de la reacción de una realización preferida que emplea los precursores ACP activado y DCPD.

60

La mezcla de los precursores secos que contenía pesos iguales de ACP y DCPD fue preparada mezclando en un molino de laboratorio SPEX 850 con una cámara de trituration de cerámica de alúmina SPEX 8505, los precursores ACP y DCPD según se describió en el Ejemplo 4; el mezclado se llevó a cabo durante 2 minutos. La preparación del precursor hidratado fue realizada añadiendo de 0,7 a 1,5 ml de agua por gramo de precursores secos mezclados. Se añadió agua (0,05 ml), preenfriada a 4°C aproximadamente, a 47,27 mg de la mezcla de precursores secos y se colocó inmediatamente en el calorímetro. El DSC (sistema de análisis térmico, serie 7 de Perkin Elmer) fue fijado a una

65

temperatura inicial de 0°C con una velocidad de barrido de 5°C/minuto. Los resultados están mostrados en la Figura 16. La gráfica representa la monitorización de los 7 primeros minutos de reactividad y muestra que esencialmente no había flujo de calor entre 0,0°C y 20°C aproximadamente, punto en el cual tenía lugar la aparición de un flujo de calor endotérmico. Las propiedades del flujo de calor indican que a 37°C la reacción es esencialmente endotérmica y, bajo las condiciones utilizadas, la reacción transcurre sólo muy lentamente, si es que tiene lugar, a temperaturas por debajo de 20°C aproximadamente. Por tanto, la reactividad neta en el sistema, esto es, la suma del flujo de calor endotérmico y exotérmico del sistema, es endotérmica.

Ejemplo 38

Ausencia de Endurecimiento en Ciertas Composiciones

Este ejemplo describe la conversión del ACP en fosfato de calcio PCA en ausencia de un promotor y demuestra la incapacidad de endurecimiento del fosfato de calcio PCA recién formado. De igual modo, el promotor DCPD no se endurece ni se convierte por sí mismo.

El DCPD y una variedad de ACPs y otros fosfatos de calcio fueron mezclados con agua y analizados para determinar su capacidad de endurecimiento a 37°C. La Tabla 6 resume estos resultados, además de identificar los productos de reacción, si es que hay alguno, después del periodo de ensayo. No se observó endurecimiento bajo ninguna circunstancia hasta 3 días. Se concluyó que aunque puede tener lugar la conversión del ACP en fosfato de calcio PCA, es deseable la presencia de un promotor para conseguir el fraguado y el endurecimiento.

TABLA 6

Conversión del ACP en Ausencia de un Promotor					
ACP	H ₂ O (g)	Incubación	Endurecimiento	FTIR	DRX
ACP (Ejemplo 5)	0,8	30 minutos	Blando	ACP	ACP
		12 horas	Blando	PCA*	PCA*
DCPD (Ejemplo 8) 38-53 µm	0,7	30 minutos	Blando	DCPD	NR
		12 horas	Blando	DCPD	
ACP (Ejemplo 7) no activado por calor	1,5	30 minutos	Blando	PCA*	NR
		12 horas	Blando	HA	
ACP (Ejemplo 5) no carbonatado	1,5	30 minutos	Blando	ACP	NR
ACP (Ejemplo 6) no activado por calor	1,5	30 minutos	Blando	ACP	NR
ACP (Ejemplo 5) no carbonatado; activado por calor	1,5	30 minutos	Blando	PCA*	NR
*PCA = fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino					
NR = análisis no realizado					

Ejemplo 39

Ejemplos de Diferentes Agentes Hidratantes Sobre el Endurecimiento y el Producto Final

Se preparó un precursor hidratado (ACP y DCPD) según se describió en los Ejemplos 4, 5 ó 37 ó 10, con la excepción de que se utilizaron una variedad de medios de hidratación. Las muestras fueron analizadas posteriormente para determinar la dureza y la finalización de la reacción a varios puntos de tiempo. En todos los casos, 1 g de los precursores mezclados fue hidratado con 0,75-1,0 ml de medio de hidratación para producir una pasta. La Tabla 7 resume los resultados y demuestra que puede utilizarse una variedad de líquidos acuosos y, en particular, de medios fisiológicamente aceptables, en la preparación del fosfato de calcio PCA.

TABLA 7

Efecto de los Agentes Hidratantes		
Medio de Hidratación	Tiempo de Incubación	Endurecimiento
Tris	30 minutos	duro
NaCl 0,9 M	30 minutos	duro
MEM	30 minutos	duro
MOPS	30 minutos	duro
HEPES	30 minutos	duro
BLIFFERALL	30 minutos	duro
PBS	30 minutos	duro

Ejemplo 40

Análisis del Endurecimiento

Se determinó la porosidad de una muestra endurecida de fosfato de calcio PCA preparada según el Ejemplo 5.

Una muestra endurecida de fosfato de calcio PCA (1 g) fue pesada inmediatamente después de ser retirada del incubador húmedo y secada posteriormente al aire a temperatura ambiente durante 12 horas. La muestra seca fue pesada cuidadosamente y a continuación se calculó su volumen. La muestra fue colocada en una muestra de agua de 20 ml. Después de 1 minuto, se observó el desplazamiento aproximado del volumen. Se encontró que la muestra seca absorbía hasta un 50-60% de su peso seco en H₂O. Se interpreta que estos resultados indican que la muestra es hasta un 50-60% porosa. La densidad era aproximadamente 1,65 g/cm³.

Ejemplo 41

Utilización de un Polímero Reabsorbible para Estimular la Conversión

Este ejemplo demuestra la utilización de un polímero reabsorbible para estimular la conversión del ACP en fosfato de calcio PCA.

Se prepara PLLA granulado y se tamiza hasta un tamaño de 100 μm . El polvo así obtenido es mezclado con el ACP del Ejemplo 37 (ACP:PLLA 5:1) y triturado durante 5 minutos en un molino de laboratorio SPEX. Se añade agua a 1 g de la mezcla para formar una pasta moldeable. A la pasta se le da la forma de una bola y se calienta a 37°C en un entorno húmedo durante 1 hora. La muestra endurecida es analizada utilizando FTIR y DRX.

Ejemplo 42

Características del Endurecimiento Sub-Ambiental

Este ejemplo investiga las características del endurecimiento del precursor hidratado a temperaturas sub-ambiente.

El precursor hidratado fue preparado con agua según se describió en el Ejemplo 37 y posteriormente cerrado herméticamente para evitar la pérdida por evaporación en un tubo con parafilm o con aluminio. Las muestras fueron posteriormente mantenidas hasta 1 hora, 24 horas y 6 días. A los puntos de tiempo indicados, la muestra hidratada fue retirada de la refrigeración y colocada en un entorno húmedo a 37°C. En todos los casos las muestras se endurecían en 30 minutos.

Ejemplo 43

Endurecimiento a Temperatura Ambiente

Este ejemplo demuestra el efecto de mantener el precursor hidratado a temperatura ambiente sin tapar.

El precursor seco fue preparado según se describió en el Ejemplo 6, excepto C. El precursor seco fue mezclado con la cantidad indicada de agua y analizado para determinar el endurecimiento y la inyectabilidad a través de una aguja de calibre 16 después de permanecer a temperatura ambiente sin tapar durante varios periodos de tiempo. Los resultados están descritos en la Tabla 8.

TABLA 8

Inyectabilidad de la Pasta Después de Permanecer a Temperatura Ambiente						
Peso de la muestra (g)	Agua añadida (ml)	Tiempo de mezclado (s)	Tiempo de permanencia (minutos)	Temperatura ambiente (°C)	Inyectabilidad a través de una aguja de calibre 16	Endurecimiento: 30 minutos/37°C
1	0,8	20	10	25	muy buena	muy bueno
1	0,8	20	20	24	muy buena	muy bueno
1	0,8	20	30	25	muy buena	muy bueno
1	0,8	20	40	25	buena	muy bueno
1	0,8	20	50	24	mala	muy bueno
5	4,2	40	10	24	muy buena	muy bueno
5	4,2	40	20	25	muy buena	muy bueno
5	4,2	40	30	25	buena	muy bueno
5	4,2	40	40	25	mala	muy bueno

Estos resultados demuestran que una muestra de un gramo puede ser estable como una pasta inyectable en condiciones de temperatura ambiente durante un tiempo de hasta 45 minutos, y que una muestra de 5 gramos puede ser estable como una pasta inyectable hasta 30 minutos en condiciones ambiente (al aire, 25°C).

Ejemplo 44

Compresión de los Precursores Utilizando una Prensa Hidráulica

Este ejemplo ilustra el método para preparar una pastilla con una prensa hidráulica.

Se utiliza una Prensa de Laboratorio Carver. Se mide en peso una cantidad específica de polvo. El polvo es posteriormente colocado en el molde del portamatriz. La altura o el espesor están determinados en parte por la cantidad de material utilizada en el molde. Una vez que el material está en el portamatriz, el molde es colocado en la prensa hidráulica. Se fija una carga deseada en la prensa. El material es comprimido posteriormente durante una cantidad de tiempo específica. Una vez que ha transcurrido el tiempo, la pastilla resultante es expulsada del portamatriz a un recipiente de conservación.

Una muestra de 0,5 g, ID=AB com1, del lote AB971002 fue comprimida a 500 psi (libras por pulgada cuadrada) durante 5 minutos en la Prensa de Laboratorio Carver. Los aspectos físicos de la pastilla resultante fueron: diámetro = 13 mm, altura = 3 mm y la densidad era de 1,27 g/cm³. La resistencia mecánica fue descrita como dura y capaz de ser partida a mano. Después del análisis mediante FTIR, la pastilla tenía un 70% de PCA en tejido húmedo, un 90% de PCA en 20 ml de agua destilada y un 100% de PCA en solución tamponada carbonatada (0,2 moles de CO₃²⁻). Una segunda muestra de 0,5 g, ID=AB com2, del lote AB971002 fue comprimida a 4700 psi durante 5 minutos en la Prensa de Laboratorio Carver. La pastilla tenía los resultados siguientes: diámetro = 13 mm, altura = 2 mm y la densidad era de 1,99 g/cm³. La resistencia mecánica fue descrita como muy dura y capaz de ser partida con la mano. Cuando la pastilla fue incubada a 37°C durante 60 horas y analizada mediante análisis FTIR, se encontraron los resultados siguientes: un 60% de PCA en tejido húmedo, un 60% de PCA en 20 ml de agua destilada y un 60% de PCA en solución tamponada carbonatada (0,2 moles de CO₃²⁻).

Ejemplo 45

Compresión de los Precursores Utilizando una Prensa Manual

Este ejemplo demuestra el método para preparar una pastilla con una prensa manual.

Se utiliza una Prensa Perkin Elmer Quick. Se producen pastillas de 7 mm de diámetro utilizando los portamatrices seleccionados junto con la Prensa Quick. Pueden utilizarse también otros portamatrices de diferentes diámetros dependiendo de las medidas deseadas. La superficie de la pastilla puede ser plana o redondeada, dependiendo de la forma del

ES 2 299 183 T3

molde. La muestra es cargada en el molde de la matriz seleccionada. A medida que aumenta la cantidad de muestra, aumenta también el grosor de la pastilla. A continuación, se selecciona una posición de referencia de las diferentes posiciones manuales dispuestas en la parte superior de la Prensa Quick. El portamatriz es colocado en posición en la Prensa Quick. Se aplica una presión constante al mango de la Prensa Quick durante un tiempo seleccionado. Una vez que ha transcurrido el tiempo, la pastilla es extraída del molde retirando la tapa inferior del portamatriz y aplicando presión a la parte superior de la matriz con el fin de expulsar la pastilla del portamatriz.

Una muestra de 0,08 g, ID=AB com3, de AB del lote AB971002 fue medida en el portamatriz de 7 mm de diámetro. La posición manual de la Prensa Quick fue fijada a 20 y se realizó la compresión durante 1 minuto. La pastilla resultante tenía un diámetro de 7 mm y una altura de 1,5 mm; la densidad era de 1,39 g/cm³. Una segunda muestra, ID=AB com4, de 0,1 g de AB del lote AB971002 fue medida en el portamatriz de 7 mm de diámetro. La posición manual fue fijada a 20 y se comprimió durante 30 segundos en la Prensa Quick. Se formó una pastilla resultante con un diámetro de 7,0 mm y una altura de 2,0 mm; la densidad era de 1,23 g/cm³.

Ejemplo 46

Comportamiento de las Pastillas de PCA con Diferentes Medios

Este ejemplo describe el comportamiento de las pastillas de fosfato de calcio PCA en diferentes medios.

Los cuatro tipos de medio elegidos fueron: α -MEM (Medio Esencial Mínimo); TBS (Suero Bovino Tris: 50 mM de Tris + 150 mM de NaCl); α -MEM + FBS (Suero Bovino Fetal al 10%); y Medio Completo (inmersión durante 2 horas en TBS a 37°C e inmersión posterior en el α -MEM + FBS).

Una muestra de 0,3 g de los precursores ACP y DCPD mezclados fue comprimida durante un minuto a 7 toneladas utilizando la Prensa de Laboratorio Carver. La pastilla resultante (a) tenía un diámetro de 12 mm y una altura de 1 mm. La pastilla fue colocada en 10 ml de agua destilada a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación, la pastilla fue colocada en 6 ml de diferentes medios a 37°C durante 24 y 48 horas.

Una segunda muestra de 1 g de los precursores ACP y DCPD mezclados fue combinada con 0,8 ml de agua destilada. La mezcla fue arrollada para formar una bola y vertida en 10 ml de agua destilada a 37°C durante 30 minutos. La bola fue posteriormente triturada utilizando un mortero y una mano de mortero para obtener un polvo fino. El polvo fue presionado durante un minuto a 7 toneladas utilizando una Prensa de Laboratorio Carver. La pastilla resultante (b) tenía un diámetro de 12 mm y una altura de 1 mm. La pastilla fue colocada posteriormente en los diferentes medios a 37°C durante 24 y 48 horas.

El pH de la solución de los medios fue medido (a 25°C) a diferentes tiempos: 0, 24 y 48 horas después de la incubación a 37°C. Los resultados de este estudio están mostrados en la Tabla 9.

TABLA 9

pH de la Solución												
Preparación de muestra	α -MEM			TBS			α -MEM+FBS			Completo		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
a	7,6	8,1	7,9	7,5	7,0	6,8	7,5	7,7	8,2	7,6	7,9	7,9
b	7,3	7,3	7,1	7,3	6,5	6,0	7,4	7,5	7,5	7,5	7,5	7,3

Ejemplo 47

Reacción de los Precursores, Liofilización, Desmenuzamiento, Compresión

Este ejemplo ilustra cómo se forma una pastilla a partir de la pasta de fosfato de calcio PCA.

Se produce PCA utilizando ACP y DCPD como promotor. Se utiliza solución salina como medio acuoso biológicamente adecuado. La pasta de PCA preparada es posteriormente endurecida *in vitro* a 37°C y liofilizada a continuación. El material de PCA es troceado posteriormente a mano. Una vez troceado, el material de PCA es moldeado para formar una pastilla mediante los métodos descritos en los Ejemplos 34 y 35.

ES 2 299 183 T3

Ejemplo 48

Moldeado, Endurecimiento, Liofilización Sin Trituración

5 Este ejemplo muestra cómo se forma una pastilla a partir de la pasta de fosfato de calcio PCA.

Se seleccionaron como precursores ACP y DCPD. Se utiliza una cantidad apropiada de solución salina para producir una pasta de PCA. La pasta de PCA es moldeada en la forma deseada. Posteriormente es incubada a 37°C *in vitro* durante 30 minutos. El objeto endurecido es posteriormente liofilizado.

10

Ejemplo 49

Experimentos In Vivo para Comparar los Métodos

15 Este ejemplo compara los métodos de producción de las pastillas mediante experimentación *in vivo*.

Las pastillas son producidas según el Ejemplo 32. Se implantan dos pastillas en el fémur de un perro. Los animales son sacrificados y los lugares de implantación son analizados para determinar el material residual remanente a los puntos de tiempo de 3, 4 y 6 semanas. A cada punto de tiempo, se preparan y se tiñen cortes descalcificados y sin descalcificar del lugar del implante. Estos cortes son analizados histomorfométricamente para determinar la similitud de las pastillas preparadas con la pasta de fosfato de calcio PCA.

20

Ejemplo 50

25 *Incorporación de un Agente de Carga o de un Aglutinante*

Este ejemplo demuestra la utilización de un agente de carga para estudiar el flujo plástico, con un interés particular en el efecto sobre la resistencia a la tracción de la pastilla.

30 Se utiliza un azúcar comprimible como agente de carga junto con la producción de la pastilla. El azúcar es mezclado con los precursores ACP y DCPD en una proporción de 1:1:1 antes de la compresión. La pastilla es producida de acuerdo con el Ejemplo 1 con modificaciones en la duración del ciclo total de compresión y en la duración de la fuerza de compresión máxima. La eficacia del azúcar agente de carga es medida comparando la resistencia a la tracción de las pastillas. La ecuación utilizada para calcular la resistencia a la tracción es:

35

$$\sigma_0 = 2F/Idt,$$

en la que σ_0 es la resistencia a la tracción, F es la fuerza necesaria para cortar la tableta, d es el diámetro de la pastilla y t es el espesor o altura de la tableta.

40

Ejemplo 51

Administración de una Vacuna en una Pastilla

45

Este ejemplo explica cómo se utiliza la pastilla como vehículo para la administración de una vacuna.

Se prepara hemocianina de la lapa ojo de cerradura a una concentración de 0,5 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,0. Se añaden 0,8 ml de esta solución a 1 g de una mezcla 1:1 de ACP activado y DCPD y se mezcla para dar lugar a una masilla. La masilla de PCA preparada es posteriormente liofilizada. El material seco es triturado durante 10 minutos para dar un polvo utilizando un molino de laboratorio SPEX 8510 con una cámara de trituración de cerámica de alúmina SPEX 8505. El PCA en polvo es posteriormente preparado como una pastilla según se describió en el Ejemplo 32. La pastilla formada según el Ejemplo 32 es implantada subcutáneamente en una rata. El proceso es repetido mensualmente durante cuatro meses. Se extraen muestras de sangre regularmente y se determina el título de anticuerpos anti-hemocianina de la lapa ojo de cerradura mediante ELISA.

55

Ejemplo 52

Fusión Entre los Cuerpos Lumbares Anteriores Caninos

60

Este ejemplo describe la utilización del fosfato de calcio PCA en la fusión de vértebras espinales caninas.

Los animales fueron anestesiados según se describió en el Ejemplo 26, colocados en posición de decúbito lateral derecho, afeitados desde la línea media anterior a la posterior, extendiéndose desde el tórax medio hacia la pelvis. Después de una preparación estéril y de cubrir al animal con un paño estéril, se llevó a cabo un abordaje retroperitoneal izquierdo estándar a la columna vertebral lumbar anterior, con exposición de las vértebras L3-L6. Los vasos segmentados que cubrían L4 y L5 fueron ligados y divididos, permitiendo la exposición anterolateral de los discos L3-4, L4-5 y L5-6. Se realizaron discotomías anteriores a cada nivel con la placa terminal preparada paralela y para

65

hacer sangrar el hueso subcondral utilizando una sierra oscilante de dos hojas paralelas (Aesculap). Después de la discotomía, una caja de titanio cilíndrica conteniendo fosfato de calcio PCA o hueso autólogo, o una caja vacía fue insertada en cada espacio discal. Se recogió un injerto óseo autólogo de la cresta ilíaca anterior izquierda mediante una incisión preparada justo antes de su inclusión en la caja y de la inserción en el espacio discal. Una vez que fueron insertadas las tres cajas, se aplicó una fijación interna utilizando tornillos para los cuerpos vertebrales de 4,5 mm y una varilla longitudinal de 6 mm de diámetro desde la L3 a la L6. Posteriormente se realizó el cierre en capas de la herida abdominal y del lugar del injerto de la cresta ilíaca utilizando suturas absorbibles y agrafes cutáneos.

Los perros fueron sacrificados a las dos y a las doce semanas y se examinó la histología de las secciones sin descalcificar para determinar la evidencia de crecimiento de hueso nuevo y de la fusión vertebral. Tras la inspección visual del explante, las vértebras de la columna parecían fusionadas utilizando el fosfato de calcio PCA de la invención.

Ejemplo 53

15 Cicatrización Ósea en Presencia del Material de PCA

La finalidad de este estudio era examinar la cicatrización ósea en presencia del material de PCA inventado.

Para este estudio, se utilizaron 30 conejos NZW adultos. A lo largo del curso del estudio estaban disponibles *ad libitum* agua corriente y pastillas de pienso certificado de conejo. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia total y condiciones asépticas. Se administró posteriormente cefazolina (22 mg/ml) 30 minutos antes de la cirugía. La anestesia constaba de 10 ml de ketamina (100 mg/ml), 1 ml de xilacina (100 mg/ml) y 5 ml de solución salina fisiológica al 0,9% (87,5 mg/kg de ketamina, 8,75 mg/kg de xilacina). El cóctel anestésico fue administrado a un nivel de dosis de 1,4 ml/kg i.m. El miembro trasero de los animales fue posteriormente afeitado y lavado con la solución quirúrgica Betadine y alcohol. Antes de la cirugía el animal fue monitorizado para asegurarse de que estaba anestesiado apropiadamente. Para realizar esto, se aplicó presión en la almohadilla subplantar. Cuando el animal dejó de responder, se interrumpió la anestesia. A lo largo de todo el procedimiento el animal fue monitorizado para determinar la contracción de los bigotes, lo cual indicaría la reanimación del animal. Utilizando una técnica aséptica, se realizó una incisión sobre la tibia proximal. El tejido blando fue retirado hacia un lado y se expuso el hueso. Se utilizó un torno manual dental con un trépano de 8 mm a baja velocidad con irrigación (solución salina fisiológica al 0,9%) cuando era necesario. El disco óseo fue liberado mediante disección y luego el lugar fue preparado para el implante. El material de PCA fue posteriormente colocado en el defecto. Los tejidos blandos fueron cerrados en capas con el material de sutura Dexon™ 3-0. Se realizó una muestra por animal utilizando este método. Los animales fueron monitorizados y se les administró buprenorfina (0,02-0,05 mg/kg, s.c.) y un antibiótico de amplio espectro cuando despertaron. El analgésico y el antibiótico fueron administrados 2 veces al día durante tres días después de la cirugía. Se extrajo sangre de cada animal antes de la eutanasia. El método utilizado para extraer sangre fue según sigue: Se administró a cada animal acepromazina (1 mg/kg, s.c.) para relajar al animal y dilatar los vasos, 15-20 minutos aproximadamente antes de la extracción de sangre. A continuación, se colocó en la arteria central de la oreja una palomilla de 23 G.

Se utilizó un vacutainer que tenía acoplado un tubo de vidrio de 2 cc para extraer no más de 2 ml de sangre del animal. Una vez que se había extraído la sangre se retiró la aguja y se aplicó presión sobre el vaso para permitir una coagulación apropiada. Además, se administraron inyecciones intramusculares durante el procedimiento quirúrgico mientras el animal estaba bajo anestesia total. El lugar del tejido blando fue posteriormente afeitado y preparado para inyecciones del material de PCA de Tipo 10.0. Se realizaron 3-5 inyecciones en el músculo lumbar utilizando una aguja hipodérmica de calibre 16. Se aplicaron a los conejos 4 ó 5 inyecciones a los puntos de tiempo de 4, 7 y 14 días con el fin de permitir la recuperación del material de PCA para análisis químico. Los puntos de tiempo restantes tenían únicamente 3 inyecciones. Cada inyección contenía 0,2 gramos aproximadamente del material de PCA. En el lado contralateral se aplicaron 3 inyecciones de material de sutura reabsorbible que actuaron como control positivo. Los animales fueron sacrificados por anestesia intravenosa con pentobarbital sódico seguido por exsanguinación por incisión de las arterias axilares. Para el análisis mediante FTIR y DRX, el material de PCA fue extraído de los lugares de los implantes en el tejido blando, congelado instantáneamente en isopentano y almacenado en un congelador a -70°C antes de su envío a ETEX Corporation en hielo seco. Se extrajeron lugares de ensayo de tejido blando y duro y se prepararon para histología.

Después de la eutanasia y la exsanguinación, los tejidos fueron extraídos de los animales, incluidos en parafina, seccionados y teñidos con hematoxilina y eosina para preparar secciones histopatológicas. A continuación, 300 mg del material de PCA recuperado fueron analizados en un difractómetro de rayos X de ánodo rotatorio Rigaku RU300 en las dependencias del Center for Materials Science and Engineering del Massachusetts Institute of Technology de Cambridge, MA el 22 de Enero de 1997. Una mezcla homogénea de 300 mg de KBr y 1,5 mg del material de PCA recuperado fue analizada mediante FTIR en un Spectrum 1000 de Perkin Elmer. Además, las secciones de tejido fueron puntuadas por la formación de hueso endosteal en un escala de 0 a +3. La áreas con infiltrados neutrofilicos tenían generalmente poco osteoprogenitor o formación de hueso nuevo. En un escala de 0 a +3, siendo 0 la no formación de hueso endosteal nuevo y siendo +3 una extensa formación de hueso endosteal nuevo, los animales tenían en el día 4 de 0 a +1, en el día 7 tenían +1 y en el día 14 tenían +2.

En el día 4 y en el día 7 era visible una ligera inflamación sobre el lugar del defecto. Los hallazgos macroscópicos en el día 14 mostraban el desarrollo de un callo óseo con forma abovedada sobre el lugar taladrado. Había una madurez

ES 2 299 183 T3

incrementada del callo óseo en el lugar del defecto en todos los grupos de ensayo cuando se evaluaron el día 21, y una falta de reacción significativa en el periostio sobre la corteza restante. Microscópicamente, el lugar del defecto había sido rellenado con hueso trabecular y cortical. Había una cantidad moderada de formación de hueso trabecular endosteal alrededor de, y extendiéndose hacia, el material de PCA. En el día 21 no había indicios de reacción adversa hacia el material de PCA implantado. Se recuperaron muestras a los días 4, 7 y 14 y se analizaron utilizando DRX. Ver la Figura _____. Estos espectros confirmaron lo siguiente: La estructura cristalina del material de PCA es estable durante al menos 14 días *in vivo* y es sustancialmente la misma que la del material de PCA preparado *in vitro*. Adicionalmente, se recuperaron muestras de los animales los días 4, 7 y 14 y se analizaron mediante FTIR. Ver la Figura _____. El material de ensayo era químicamente estable y la reacción se había completado *in vivo*. El material de PCA no causó ninguna respuesta inflamatoria inaceptable cuando se implantó intramuscularmente o en el lugar de un defecto óseo. Mediante el análisis de DRX y FTIR, se determinó que el material de PCA era químicamente estable *in vivo* hasta 21 días después del implante.

Ejemplo 54

Cuantificación de la Cicatrización Ósea con el Material de PCA

El objetivo de este estudio era cuantificar la cicatrización ósea en presencia del PCA de la invención y monitorizar la reabsorción de material de PCA implantado.

El protocolo fue firmado el 14 de Febrero de 1996 y el estudio se llevó a cabo en Bio-Research Laboratories Ltd., 87 Senneville Rd., Senneville, Quebec, Canadá, H9X 3R3 de acuerdo con las Regulaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio de la FDA de Estados Unidos (21 CFR Parte 58). Las cirugías se llevaron a cabo el 15, 16, 22, 23 y 29 de Febrero y en Marzo de 1996 (para el estudio de 6 meses) y el 11 y 12 de Abril de 1996 (para el estudio de 1 año).

Los perros beagle (*canis familiaris*) fueron obtenidos de HRP Inc., 6321 South 6th Street, Kalamazoo, MI 49009, EE.UU. Los perros fueron alojados individualmente en jaulas de acero inoxidable equipadas cada una de ellas con un suelo de tipo barras y una válvula para bebida automática en 4 salas separadas. Los animales tenían acceso a un pienso para perros comercial en pastillas certificado estándar (400 g - PMI Certified DogChow 5007: PMI Feeds Inc.) una vez al día y los cuencos permanecían en las jaulas durante 24 horas aproximadamente (excepto durante los procedimientos indicados). Además, algunos animales recibieron ocasionalmente un suplemento dietético de alimento enlatado, Mixit o Canine ID (Hill's Science Diet). Agua corriente municipal fue suministrada *ad libitum*.

El material de PCA fue suministrado como un polvo estéril en paquetes prepesados. El material fue preparado el día de la cirugía para el implante. El material fue hidratado con las cantidades apropiadas de agua estéril y almacenado tapado a temperatura ambiente antes del implante. Cada perro recibió una dosis de Penlong-XL (Benzatina penicilina G y Procaína penicilina G) (1 ml) intramuscularmente al menos 1 hora antes de la cirugía y de nuevo 2 días después de la cirugía. Cada animal fue preanestesiado con una inyección intramuscular de AC-Promazina (0,05 mg/kg), Butorfanol (0,2 mg/kg) y Glicopirrolato (0,01 mg/kg) al menos 10 minutos antes de la preparación quirúrgica. Los animales fueron posteriormente preparados para la cirugía afeitando uno (Grupos 1 y 2) o ambos (Grupos 3 y 4) miembros posteriores, desde la pelvis hasta la parte inferior de la pata. El área afeitada fue lavada con Hibitane™ (gluconato de clorhexidina al 4%) seguido por una aplicación abundante de isopropanol al 70% y Betadine™ (povidona yodada al 10%). Los animales fueron anestesiados con una inyección intravenosa de tiopentona sódica al 2,5% y el lugar de la inyección subcutánea (región torácica dorsal media) del Grupo 2 fue preparado de la misma manera. Antes de la cirugía, se administró a cada ojo un ungüento Duratears™. Todos los animales fueron intubados y mantenidos bajo anestesia con isoflurano para el procedimiento quirúrgico. Ringer lactado (a una velocidad de 10 ml/kg/hora) fue administrado perioperativamente.

Se realizó una incisión cutánea longitudinal a lo largo de la superficie lateral del miembro posterior para exponer 8-10 cm aproximadamente del fémur. El periostio que cubría el fémur fue retirado hacia un lado del hueso. Se aplicó un plantilla (que medía 6 cm) para identificar los lugares de los orificios que iban a ser taladrados en cada extremo de la caña del hueso. Utilizando un taladro del tamaño apropiado, se retiró un fragmento de hueso de 3-5 mm de profundidad aproximadamente de cada extremo de la caña y utilizando una sierra oscilante este orificio fue alargado distalmente 4-5 cm aproximadamente. Se extrajo la médula y cualquier sangrado significativo fue controlado apropiadamente. En los animales del Grupo 1, después de crear el lugar del defecto, el hueso extraído fue cortado en pequeños fragmentos, lavado con solución salina y introducido en el lugar del defecto como aplicación ósea autóloga. En los animales del Grupo 2, después de la creación del lugar del defecto, el material sustituto del hueso fue colocado en el lugar del defecto, asegurándose de no dejar una cantidad en exceso del material en los tejidos circundantes. Después de este procedimiento, se inyectó subcutáneamente en la región torácica dorsal media una cantidad de -- de BSMTM (hasta constituir una dosis total de 25 g). En el caso de los animales de los Grupos 3 y 4, después de la creación del lugar del defecto en el primer miembro posterior, el material sustituto del hueso fue colocado en el lugar del defecto, asegurándose de no dejar una cantidad en exceso del material en los tejidos circundantes. El hueso extraído fue cortado en pequeños fragmentos y lavado con solución salina. Se creó un lugar de defecto en el miembro opuesto y el hueso preparado fue colocado en ese lugar. Cada lugar de defecto fue marcado colocando una pieza de 1 mm de un hilo metálico K en cada extremo de la hendidura. Posteriormente la fascia fue suturada con sutura reabsorbible para asegurar que el material permanecía en su lugar. El lugar quirúrgico fue cerrado con agrafes quirúrgicos y los agrafes fueron retirados 10 días después de la cirugía aproximadamente.

ES 2 299 183 T3

Se realizó una radiografía de ambos miembros posteriores de cada animal del Grupo 3 el día de la necropsia para la Semana 0, y en todos los animales supervivientes del Grupo 3 en las Semanas 3, 12 y 26. Los animales fueron sedados para el procedimiento. Los animales fueron sacrificados mediante anestesia intravenosa con pentobarbital sódico seguido por exsanguinación por incisión de las arterias axilares. Los tejidos indicados anteriormente fueron preparados mediante inclusión en parafina, corte y tinción con hematoxilina y eosina. La mitad de cada lugar de implante femoral (Grupos 1, 2 y 4) fue preparada como una sección descalcificada y preparada como cortes teñidos con hematoxilina y eosina y tricómico de Masson. La mitad restante de cada sitio de implante fue conservada en alcohol al 70% y preparada como una sección sin descalcificar (en un medio de inclusión apropiado) y teñida con von Kossa y tricómico de Goldner mientras que se fijó en fluido de Zenker.

Después del análisis histopatológico, se llevó a cabo un análisis histomorfométrico. Los límites del defecto fueron determinados subjetivamente y el área total del hueso y del material de PCA presente fue tabulada para la región del defecto. La histomorfometría confirmaba y ampliaba la histopatología. Los datos histomorfométricos de todas las secciones sin descalcificar teñidas con von Kossa de todos los grupos experimentales disponibles fueron agrupados en cada punto de tiempo de acuerdo con el tipo de implante, independientemente de si los animales eran del grupo 1, 2 ó 4. Los resultados de la formación de hueso nuevo en los defectos tratados con el material de PCA y en los defectos tratados con el autoinjerto, así como de la reabsorción del material de PCA, están presentados en la Figura _____. La formación de hueso nuevo en los receptores del autoinjerto parecía tener lugar ligeramente antes que la formación de hueso nuevo en los receptores del material de PCA. A las cuatro semanas, el hueso nuevo en los receptores del autoinjerto alcanzó un valor casi máximo del 74,7% +/- 20 (SEM; n=8). Hacia la semana 26 los valores del autoinjerto habían disminuido hasta el 56,78% +/- 20,9 (SEM; n=4), sugiriendo que la remodelación incrementada estaba teniendo lugar debido quizá al fracaso de algunas regiones de injerto. Aunque el hueso nuevo no alcanzó su valor máximo (77,18% +/- 11,2, SEM; n=8) hasta la semana 12 en los receptores del material de PCA, la remodelación aparente observada en los autoinjertos a las 26 semanas no fue observada en los receptores del material de PCA. Los valores del material de PCA en la semana 26 (78% +/- 21,5, SEM; n=4) eran comparables a los valores de la semana 12. El material de PCA residual observable representaba menos del 95% del área superficial total del defecto hacia la semana 4 y menos de un 0,3% hacia la semana 26. Como el defecto fue rellenado originalmente un 100% con el material de PCA, la reabsorción era mayor del 99% hacia la semana 26.

REIVINDICACIONES

1. Un vehículo para la administración de un agente biológicamente activo, que comprende

(A) un agente biológicamente activo seleccionado del grupo que consta de polipéptidos, polinucleótidos, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, sustancias anti-SIDA, sustancias anticancerosas, antisépticos, inhibidores del ECA, antígenos, antagonistas adrenérgicos, antiácidos, inmunosupresores o factores inmunomoduladores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sustancias antiParkinsonianas, antiespasmódicos, contracturantes musculares, antidiarreicos, antieméticos, laxantes, diuréticos, mióticos, anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios, compuestos antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, agentes antitusivos, medicaciones antivértigo, medicaciones antinertigicas, medicaciones contra el mareo por movimiento, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, agentes para la producción de imágenes, agentes vectorizantes específicos, factores tróficos, factores de crecimiento, neurotransmisores, modificadores de la respuesta celular y vacunas, y

(B) un fosfato de calcio apatítico sintético débilmente cristalino (PCA) obtenible a partir de un proceso que comprende:

la exposición de un fosfato de calcio amorfo (ACP) a un promotor seleccionado de fosfatos de calcio ácidos en presencia de una cantidad limitada de una solución acuosa,

de tal manera que se forme un precursor hidratado con consistencia de pasta o masilla.

2. Un vehículo para la administración de un agente biológicamente activo, que comprende

(A) un agente biológicamente activo seleccionado del grupo que consta de polipéptidos, polinucleótidos, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, sustancias anti-SIDA, sustancias anticancerosas, antisépticos, inhibidores del ECA, antígenos, antagonistas adrenérgicos, antiácidos, inmunosupresores o factores inmunomoduladores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sustancias antiParkinsonianas, antiespasmódicos, contracturantes musculares, antidiarreicos, antieméticos, laxantes, diuréticos, mióticos, anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios, compuestos antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, agentes antitusivos, medicaciones antivértigo, medicaciones antinertigicas, medicaciones contra el mareo por movimiento, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, agentes para la producción de imágenes, agentes vectorizantes específicos, factores tróficos, factores de crecimiento, neurotransmisores, modificadores de la respuesta celular y vacunas, y

(B) un fosfato de calcio apatítico sintético débilmente cristalino (PCA) endurecido obtenible a partir de un proceso que comprende:

la exposición de un fosfato de calcio amorfo (ACP) a un promotor seleccionado de fosfatos de calcio ácidos en presencia de una cantidad limitada de una solución acuosa,

de tal manera que se forme un precursor hidratado con consistencia de pasta o masilla,

y permitiendo que el precursor hidratado se endurezca.

3. El vehículo de la reivindicación, en el que el fosfato de calcio PCA es formado a partir de un precursor hidratado que se endurece a 22°C después de un tiempo mayor de una hora o que se endurece a 37°C después de un tiempo menor de una hora, preferiblemente después de 10 a 30 minutos.

4. El vehículo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el promotor fosfato de calcio ácido es seleccionado de tal manera que, en combinación con el ACP, se obtenga un fosfato de calcio PCA con una proporción Ca/P en el rango de 1,1 a 1,9 aproximadamente.

5. El vehículo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el promotor fosfato de calcio ácido es seleccionado del grupo que consta de fosfato dicálcico dihidrato, metafosfato de calcio, decafosfato de heptacalcio, fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino, pirofosfato de calcio, fosfato octacálcico y fosfatos tricálcicos.

6. El vehículo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un material adicional seleccionado para cambiar un parámetro físico del vehículo, donde el parámetro físico es seleccionado del grupo que consta de resistencia, tiempo de reabsorción, adherencia, inyectabilidad, características de fricción y cinética de liberación.

7. El vehículo de la reivindicación 4, en el que el fosfato de calcio PCA tiene una proporción Ca/P menor de 1,5.

8. Un método para producir un vehículo para la administración de un agente biológicamente activo, que comprende las etapas de:

- la mezcla, en cualquier orden, de un fosfato de calcio amorfo (ACP) y una solución acuosa, la adición de un agente biológicamente activo seleccionado del grupo que consta de polipéptidos, polinucleótidos, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, sustancias anti-SIDA, sustancias anticancerosas, antisépticos, inhibidores del ECA, antígenos, antagonistas adrenérgicos, antiácidos, inmunosupresores o factores inmunomoduladores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sustancias antiParkinsonianas, antiespasmódicos, contracturantes musculares, antidiarreicos, antieméticos, laxantes, diuréticos, mióticos, anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios, compuestos antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, agentes antitusivos, medicaciones antivértigo, medicaciones antinertígicas, medicaciones contra el mareo por movimiento, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, agentes para la producción de imágenes, agentes vectorizantes específicos, factores tróficos, factores de crecimiento, neurotransmisores, modificadores de la respuesta celular y vacunas, y

la exposición del ACP reactivo a un promotor seleccionado de fosfatos de calcio ácidos antes, durante o después de las etapas de mezclado y adición,

de tal manera que se forme un precursor hidratado con consistencia de pasta o masilla.

9. Un método para la producción de un vehículo para la administración de un agente biológicamente activo, que comprende las etapas de:

- la mezcla, en cualquier orden, de un fosfato de calcio amorfo (ACP) y una solución acuosa, la adición de un agente biológicamente activo seleccionado del grupo que consta de polipéptidos, polinucleótidos, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, sustancias anti-SIDA, sustancias anticancerosas, antisépticos, inhibidores del ECA, antígenos, antagonistas adrenérgicos, antiácidos, inmunosupresores o factores inmunomoduladores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sustancias antiParkinsonianas, antiespasmódicos, contracturantes musculares, antidiarreicos, antieméticos, laxantes, diuréticos, mióticos, anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios, compuestos antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, agentes antitusivos, medicaciones antivértigo, medicaciones antinertígicas, medicaciones contra el mareo por movimiento, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, agentes para la producción de imágenes, agentes vectorizantes específicos, factores tróficos, factores de crecimiento, neurotransmisores, modificadores de la respuesta celular y vacunas, la exposición del ACP reactivo a un promotor seleccionado de fosfatos de calcio ácidos antes, durante o después de las etapas de mezclado y adición, de tal manera que se forme un precursor hidratado con consistencia de pasta o masilla, y

- el permitir que la mezcla se endurezca, mediante lo cual se forma un fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino sintético (PCA).

10. Un método para la producción de un vehículo para la administración de un agente biológicamente activo, que comprende las etapas de:

- la mezcla, en cualquier orden, de un fosfato de calcio amorfo (ACP) y una solución acuosa, y la exposición del ACP a un promotor seleccionado de fosfatos de calcio ácidos antes, durante o después de las etapas de mezclado y adición, de tal manera que se forme un precursor hidratado con consistencia de pasta o masilla,

- el permitir que la mezcla se endurezca, mediante lo cual se forma un fosfato de calcio apatítico sintético débilmente cristalino (PCA), y

- la adición del agente biológicamente activo seleccionado del grupo que consta de polipéptidos, polinucleótidos, nucleoproteínas, polisacáridos, glicoproteínas, sustancias anti-SIDA, sustancias anticancerosas, antisépticos, inhibidores del ECA, antígenos, antagonistas adrenérgicos, antiácidos, inmunosupresores o factores inmunomoduladores, sustancias antivirales, inhibidores enzimáticos, neurotoxinas, opioides, hipnóticos, antihistamínicos, lubricantes, tranquilizantes, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sustancias antiParkinsonianas, antiespasmódicos, contracturantes musculares, antidiarreicos, antieméticos, laxantes, diuréticos, mióticos, anticolinérgicos, compuestos antiglaucoma, compuestos antiparasitarios, compuestos antiprotozoos, antihipertensivos, analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, agentes antitusivos, medicaciones antivértigo, medicaciones antinertígicas, medicaciones contra el mareo por movimiento, anestésicos locales, oftálmicos, prostaglandinas, antidepresivos, sustancias antipsicóticas, agentes para la producción de imágenes, agentes vectorizantes específicos, factores tróficos, factores de crecimiento, neurotransmisores, modificadores de la respuesta celular y vacunas.

ES 2 299 183 T3

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el promotor de fosfato de calcio ácido es seleccionado de tal manera que, en combinación con el ACP, se obtenga un fosfato de calcio PCA con una proporción Ca/P en el rango de 1,1 a 1,9 aproximadamente.

5 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el promotor de fosfato de calcio ácido es seleccionado del grupo que consta de fosfato dicálcico dihidrato, metafosfato de calcio, decafosfato de heptacalcio, fosfato de calcio apatítico débilmente cristalino, pirofosfato de calcio, fosfato octacálcico y fosfatos tricálcicos.

10 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que la solución acuosa es una solución tamponada seleccionada por su compatibilidad con el agente biológicamente activo.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el endurecimiento está asociado con una reacción endotérmica.

15 15. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, que incluye además una etapa de modelado del fosfato de calcio PCA para darle una forma predeterminada.

16. El método de la reivindicación 11, en el que el fosfato de calcio PCA tiene una proporción Ca/P menor de 1,5.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

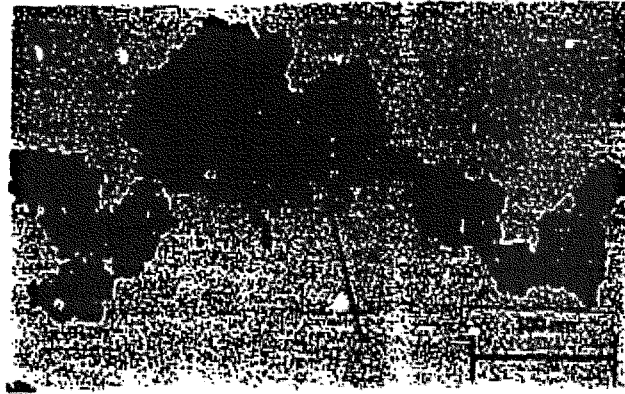
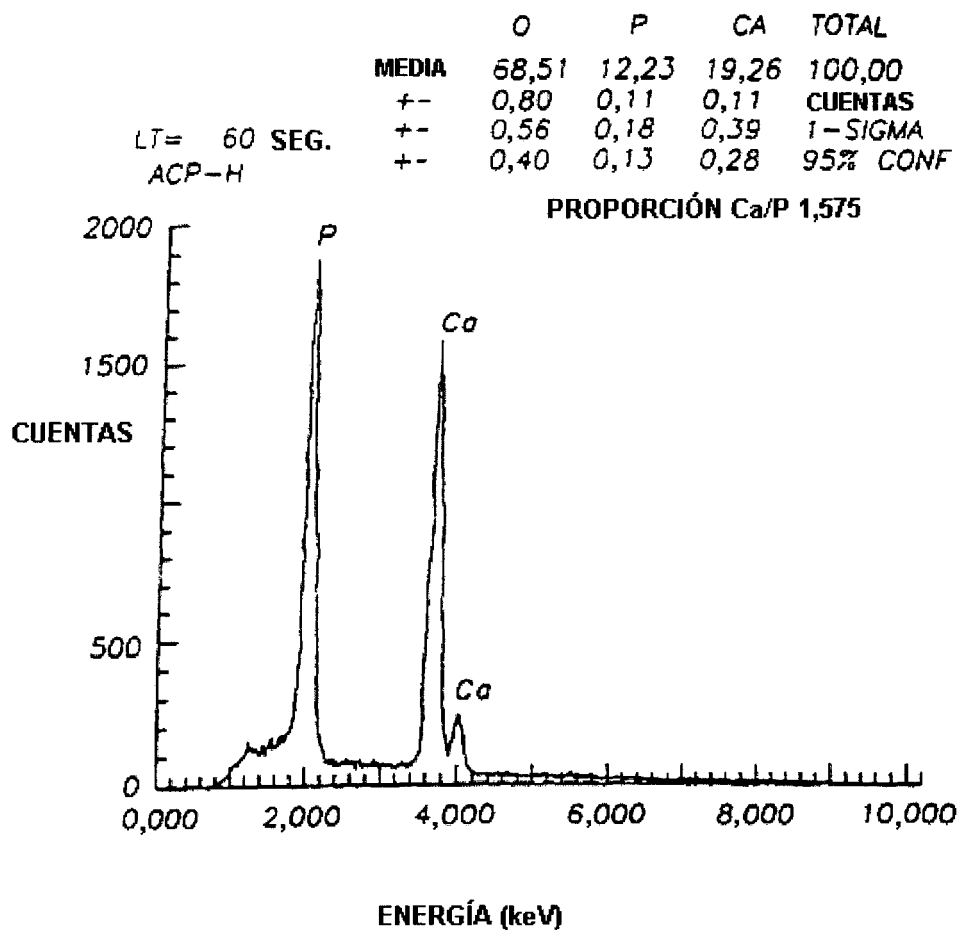


FIG. 2



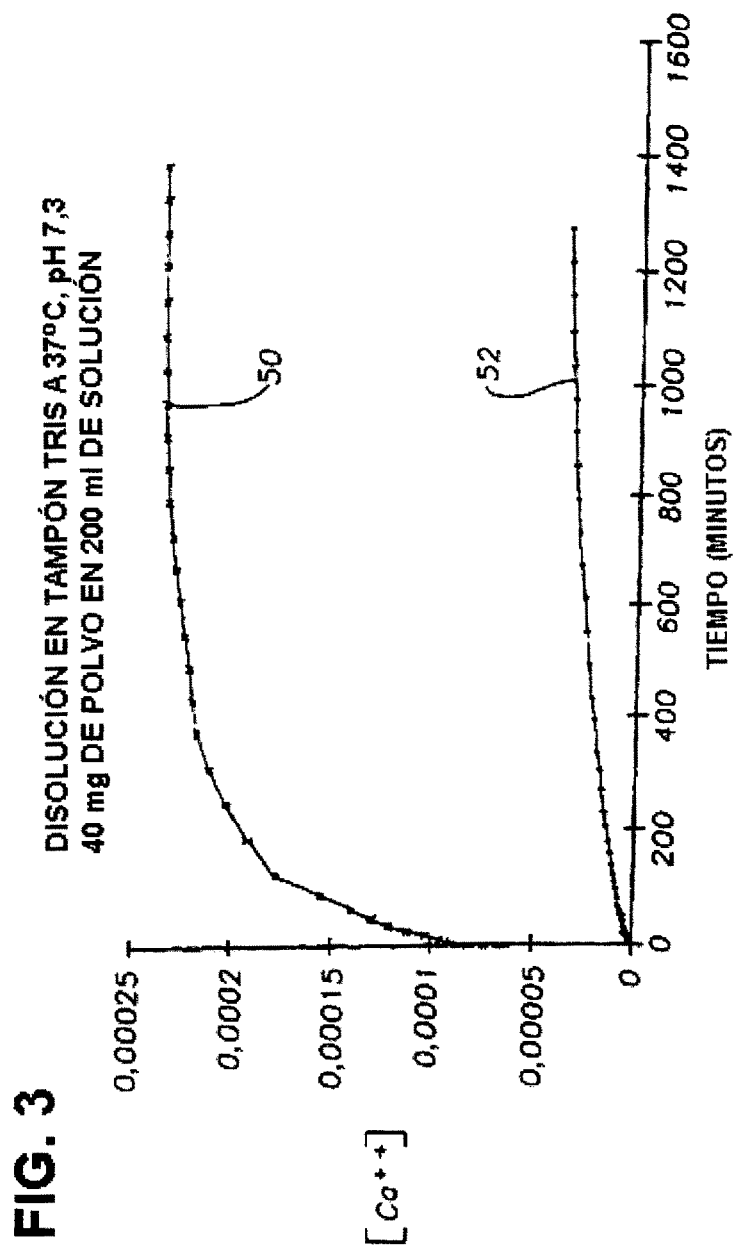
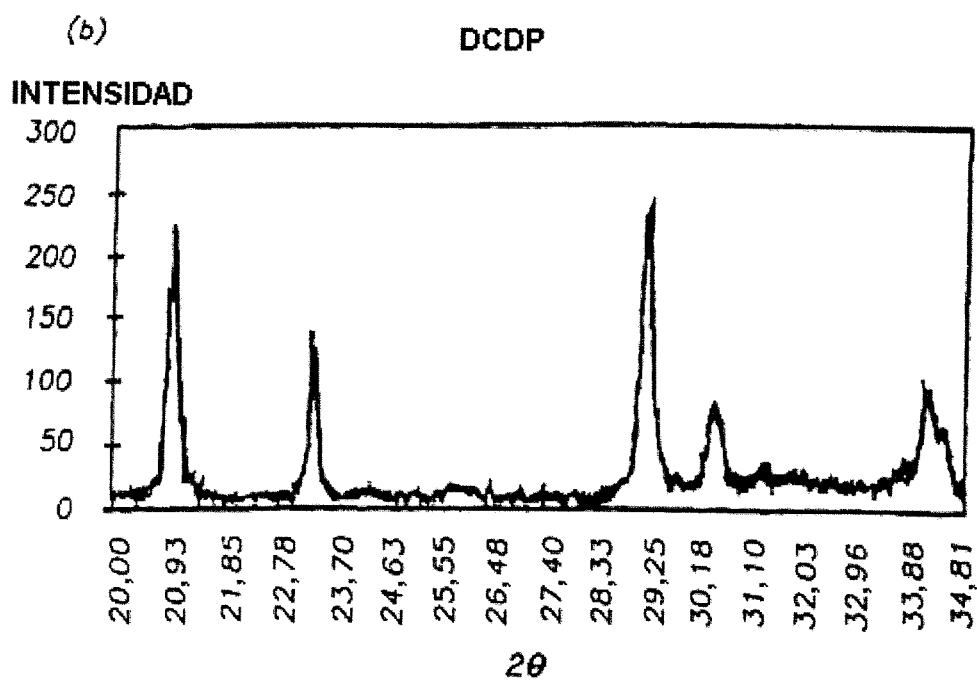
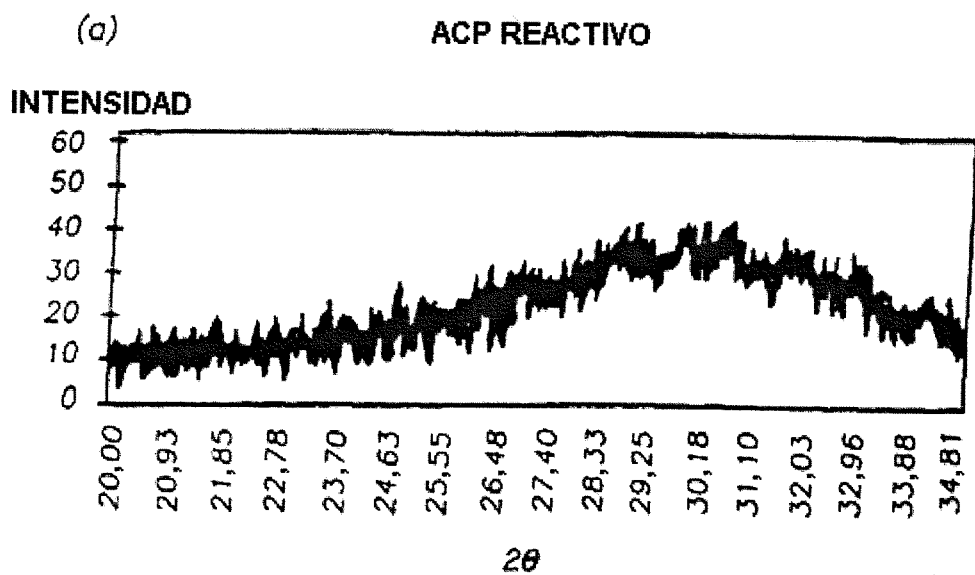


FIG. 4



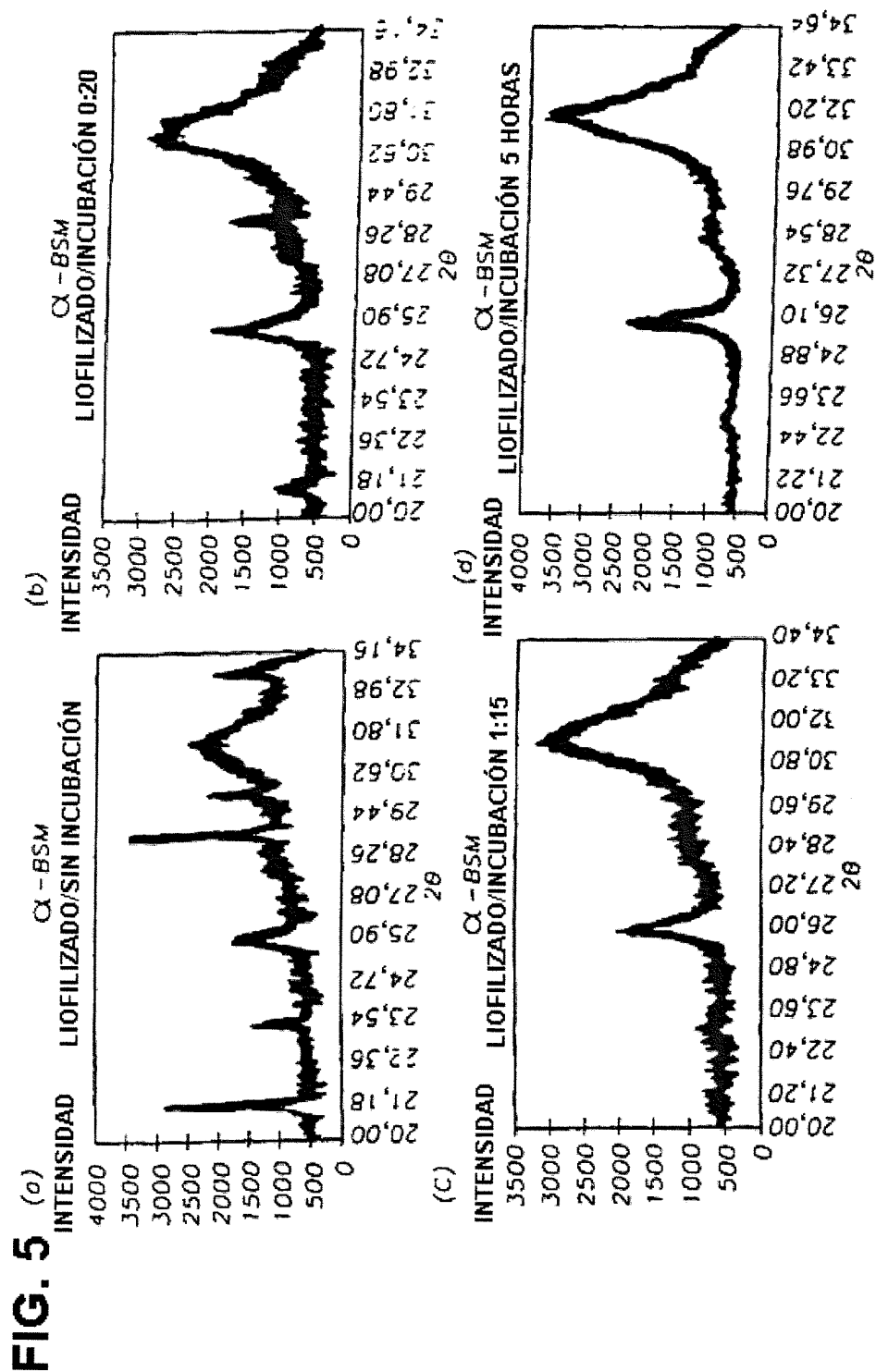


FIG. 6

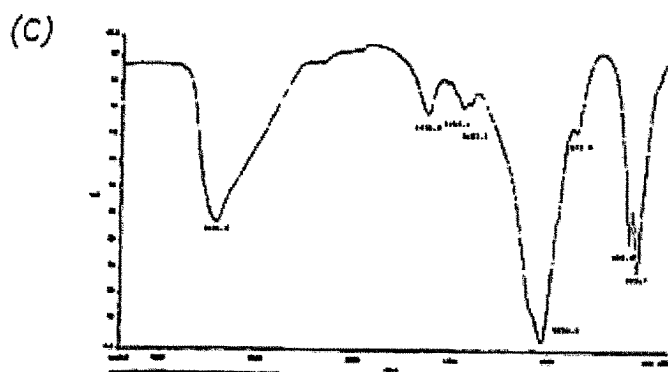
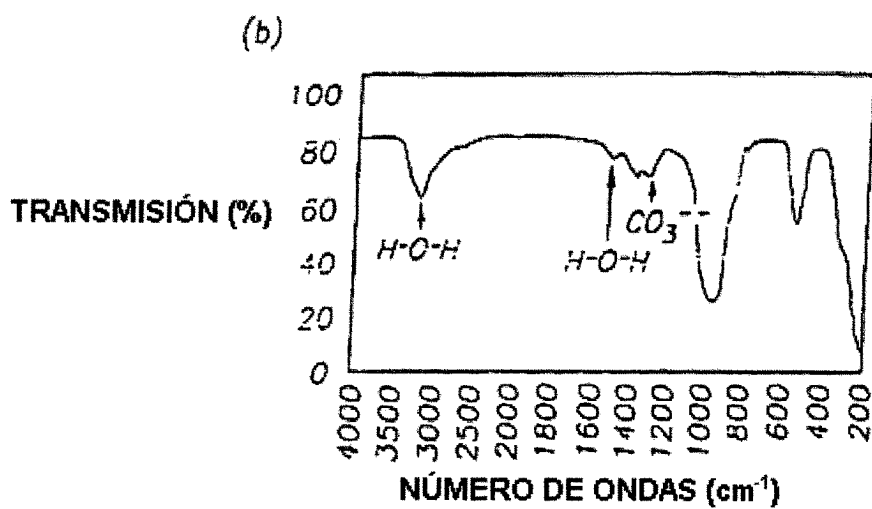
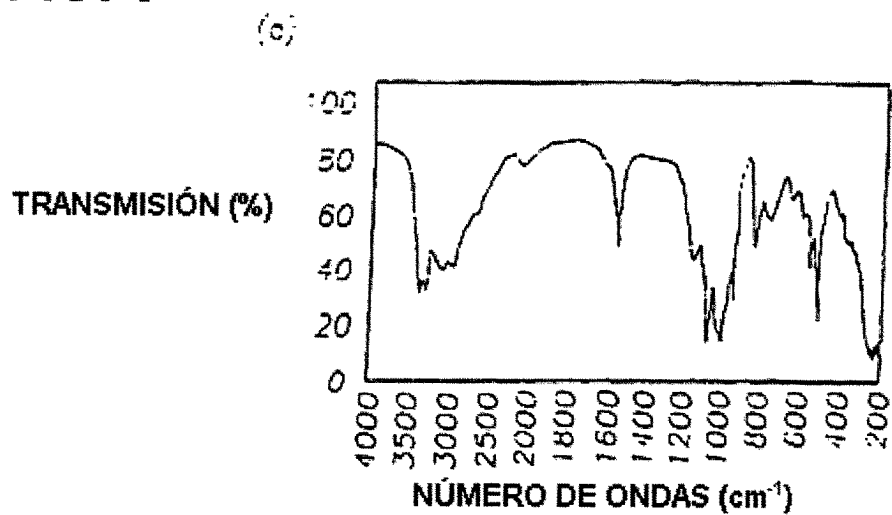
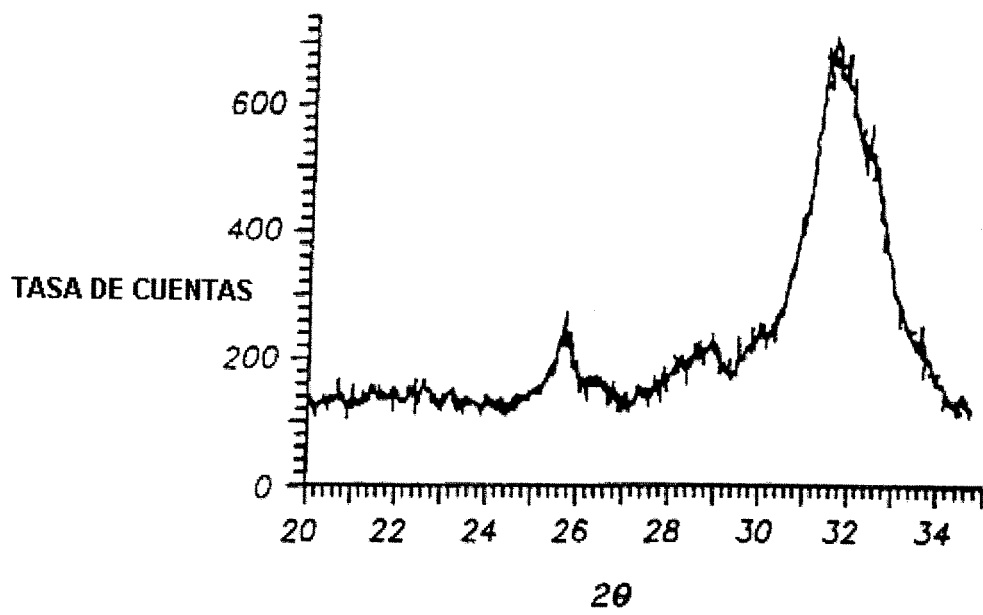
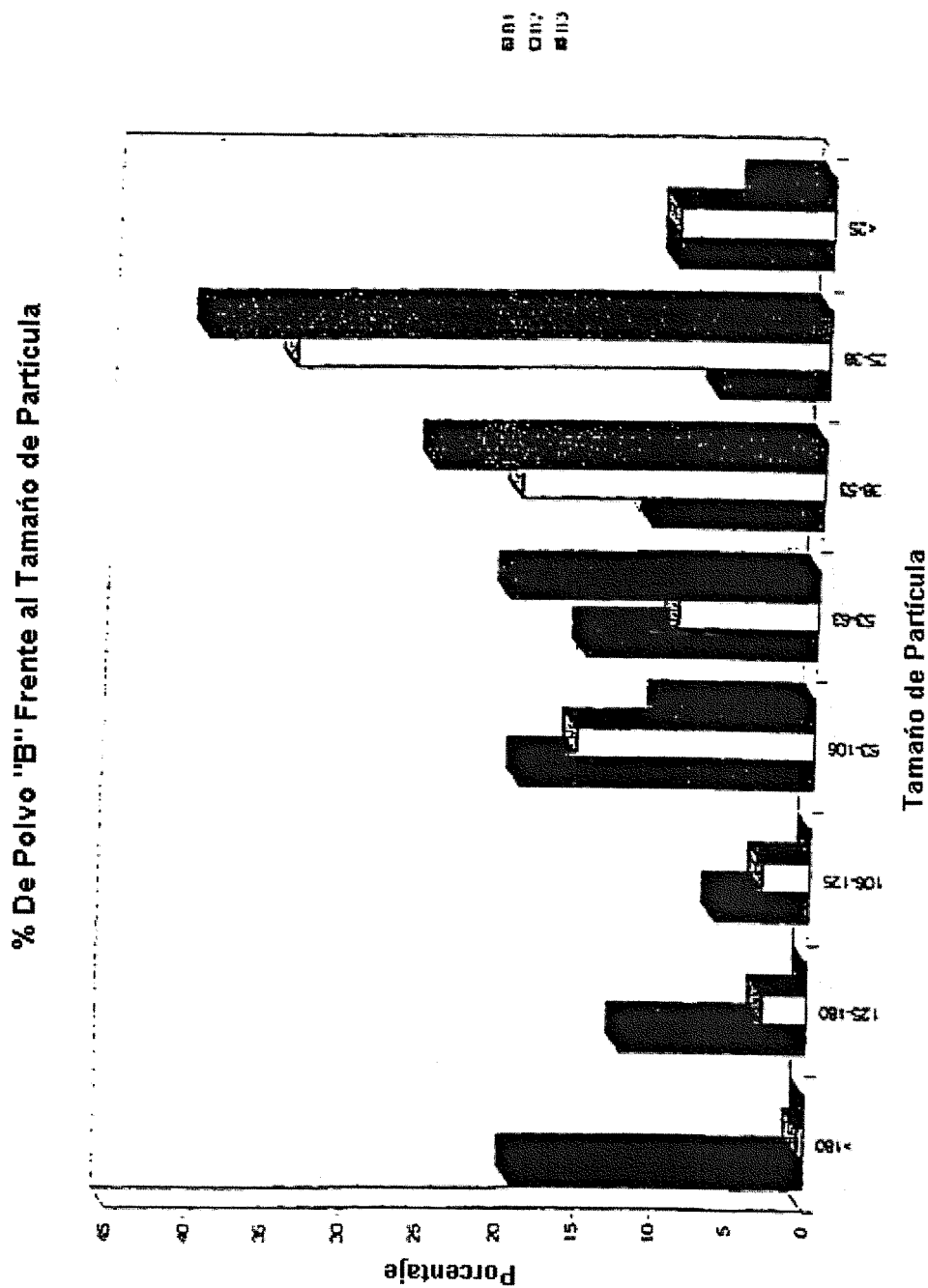


FIG. 7





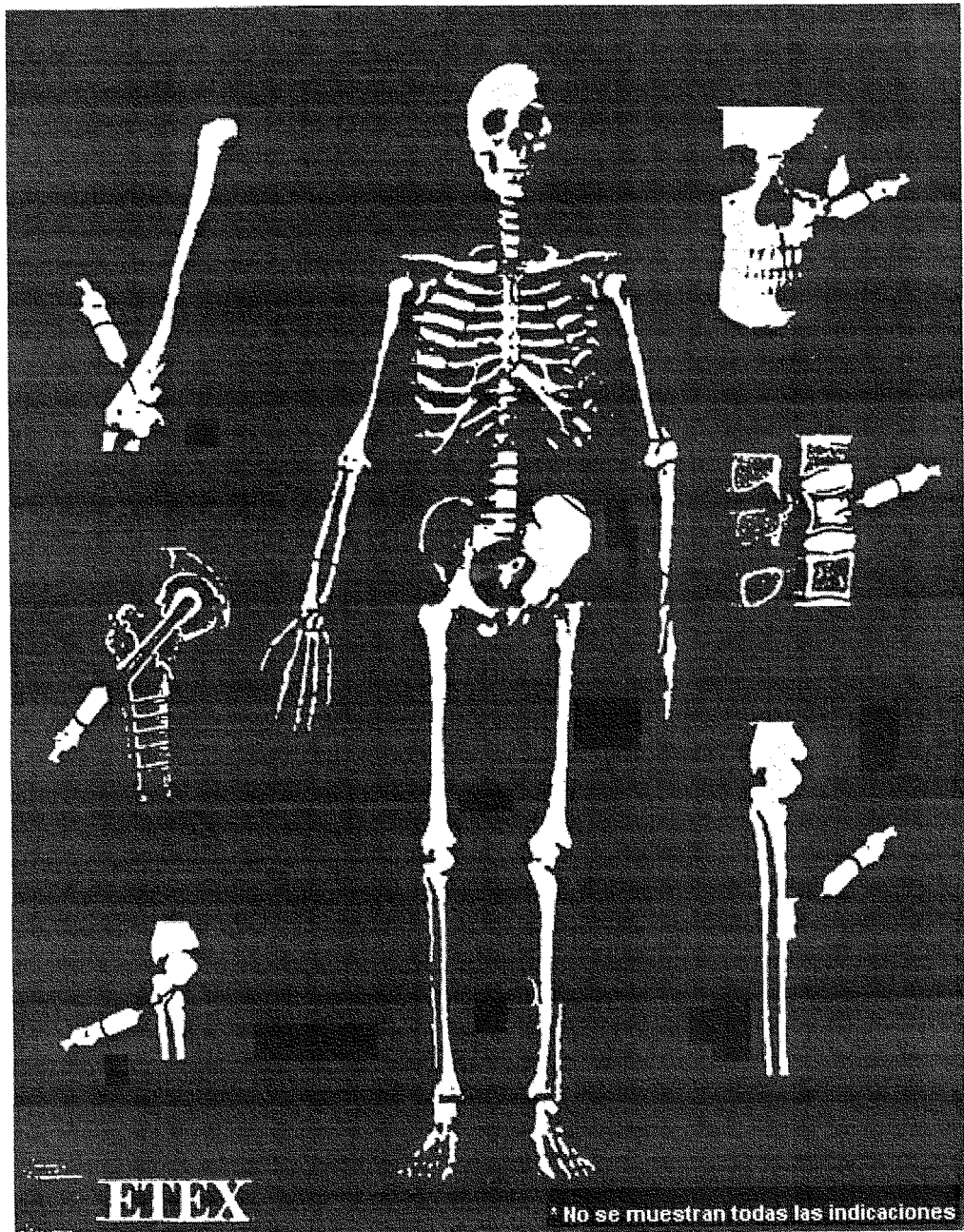
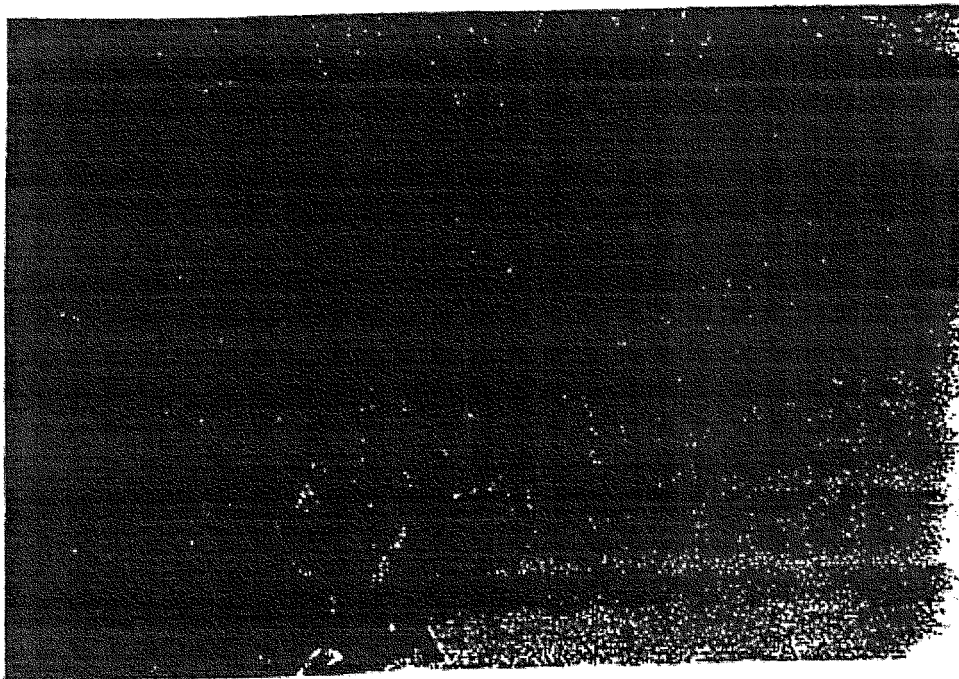


FIG. 9

Estudio EX96-1-002

Ensayo de Selección de Material Sustitutivo de Hueso (BSM™) en el Modelo de Defectos Óseos en Tibia Proximal de Conejo NZW

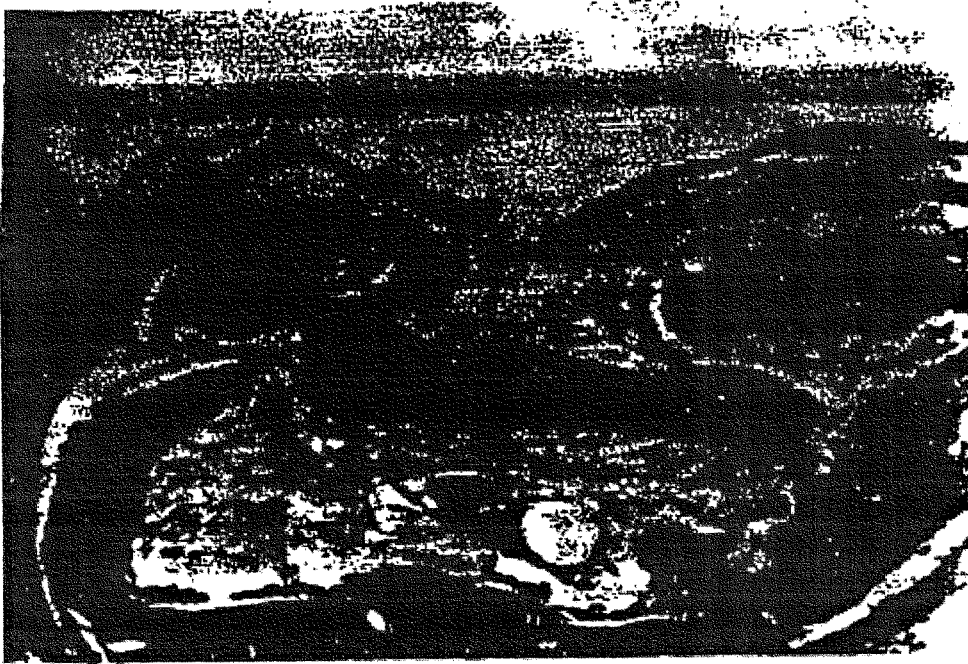


Proximogram of a bone defect treated with BSM from rabbit NZW. Observed after 120 days. Large areas of bone growth are visible on one edge of the defect. New bone is the part of the defect edge with traces of bone. Magnification of defect area: normal, 10x; BSM, 20x.

FIG. 10B

Estudio EX95-1-004

**Estudio Piloto de Eficacia del Material Sustitutivo de Hueso (BSM™)
en el Modelo de Defectos Óseos en Tibia Proximal Canina**

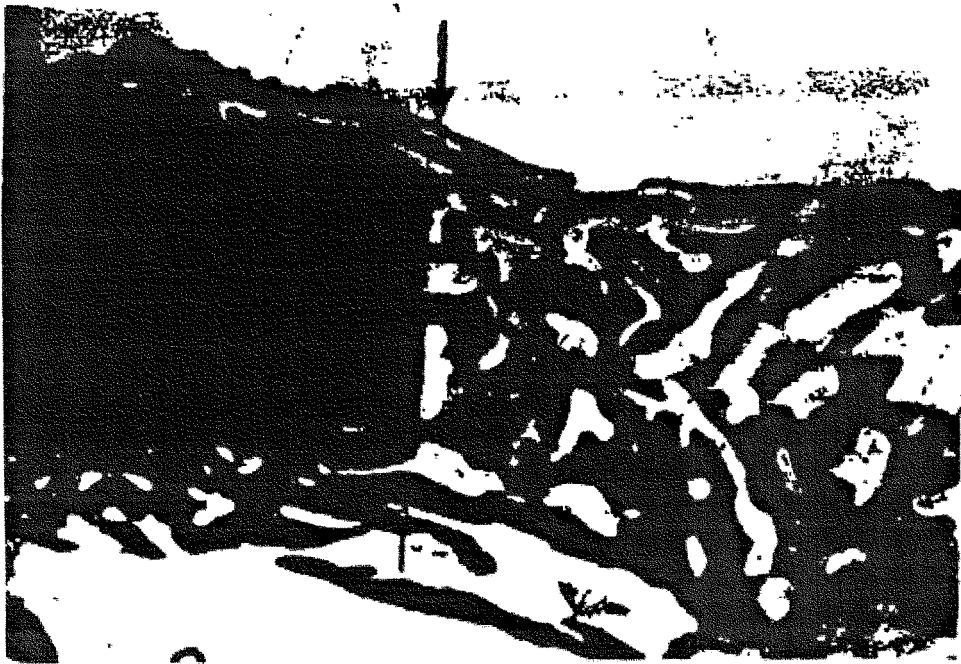


Fotomicrografía del hueso trabecular canino crecido en el lugar del defecto tratado con BSM. Las flechas pequeñas indican células similares a osteoblastos que tapizan las espículas óseas y son indicativas de una actividad celular incrementada. (Aumento 10X; muestra descalcificada teñida con Hematoxilina y Eosina)

FIG. 11

Estudio EX95-1-004

**Estudio Piloto de Eficacia del Material Sustitutivo de Hueso (BSM™)
en el Modelo de Defectos Óseos en Tibia Proximal Canina**

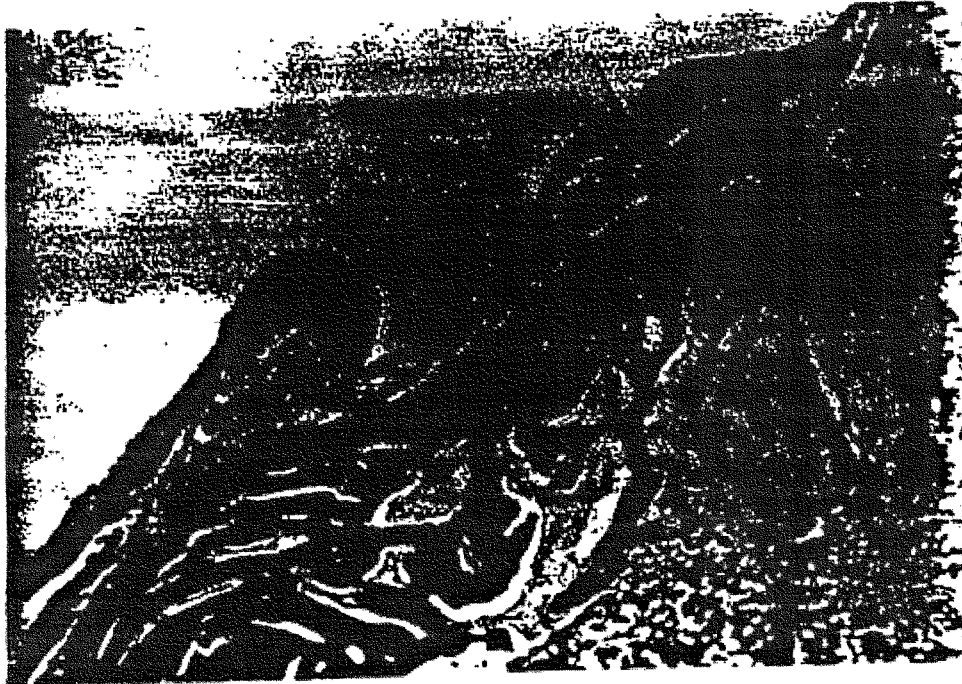


Fotomicrografía de un defecto de hueso cortical canino que fue tratado con BSM. Las flechas grandes indican un borde del defecto. El crecimiento de hueso nuevo está a la derecha del defecto y a las 4 semanas después de la cirugía es hueso trabecular denso. (Aumento 10X; muestra sin descalcificar teñida con Fucsina Básica Verde Claro)

FIG. 12

Estudio EX95-1-005

Establecimiento de un Ensayo de Selección de Material Sustitutivo de Hueso (BSM™) en el Modelo de Defectos Óseos en Tibia Proximal de Conejo NZW

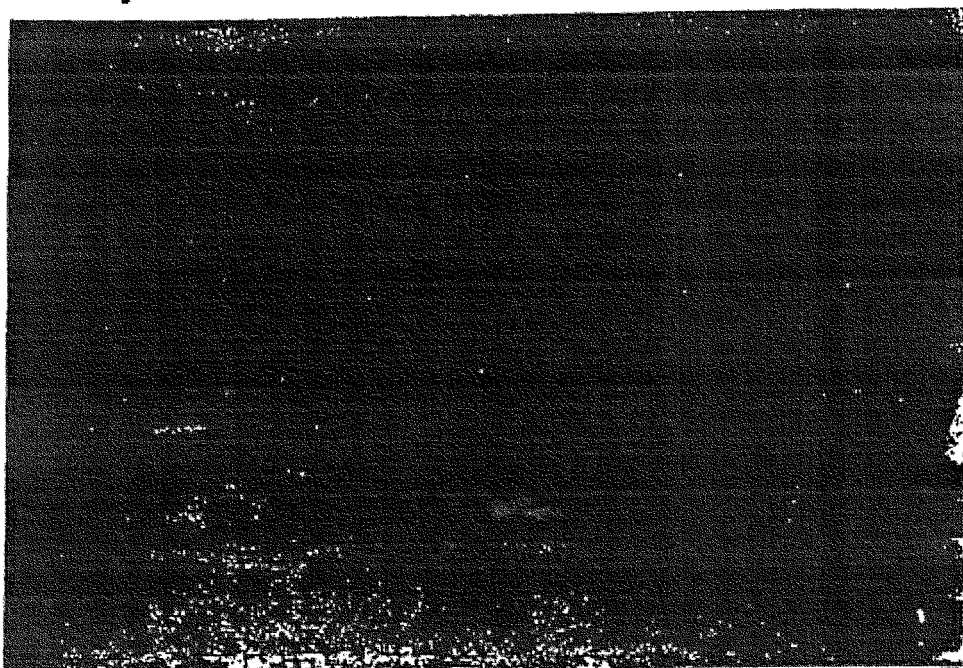


Fotomicrografía de un defecto tibial sin tratar (control) en el Conejo #31 cuatro semanas después de la cirugía. La flecha grande indica el borde del defecto. Las cabezas de flecha pequeñas indican el defecto remanente sin hueso. Las flechas pequeñas indican una abundancia de tejido conectivo fibroso en el lugar del defecto. La cabeza de flecha grande señala hueso trabecular nuevo en el defecto. (Aumento 4X; muestra descalcificada teñida con Tricrómico de Masson)

FIG. 13A

Estudio EX95-1-005

Establecimiento de un Ensayo de Selección de Material Sustitutivo de Hueso (BSM™) en el Modelo de Defectos Óseos en Tibia Proximal de Conejo NZW



Proton micrograph of a bone defect from rabbit NZW. The defect is located in the proximal tibia. The arrow points to the edge of the defect. The image shows the bone structure and the defect area.

FIG. 13B



FIG. 14

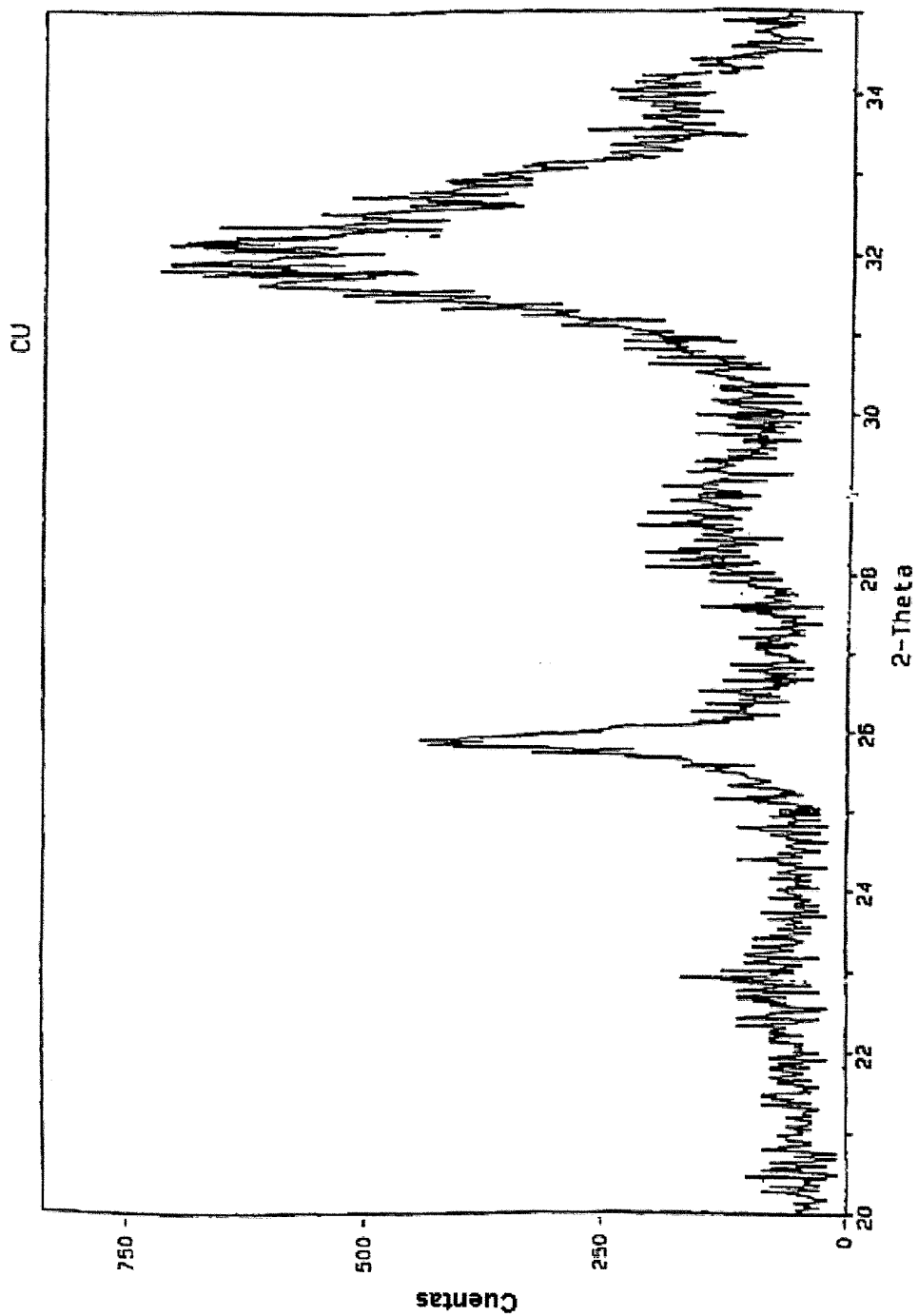


FIG. 15

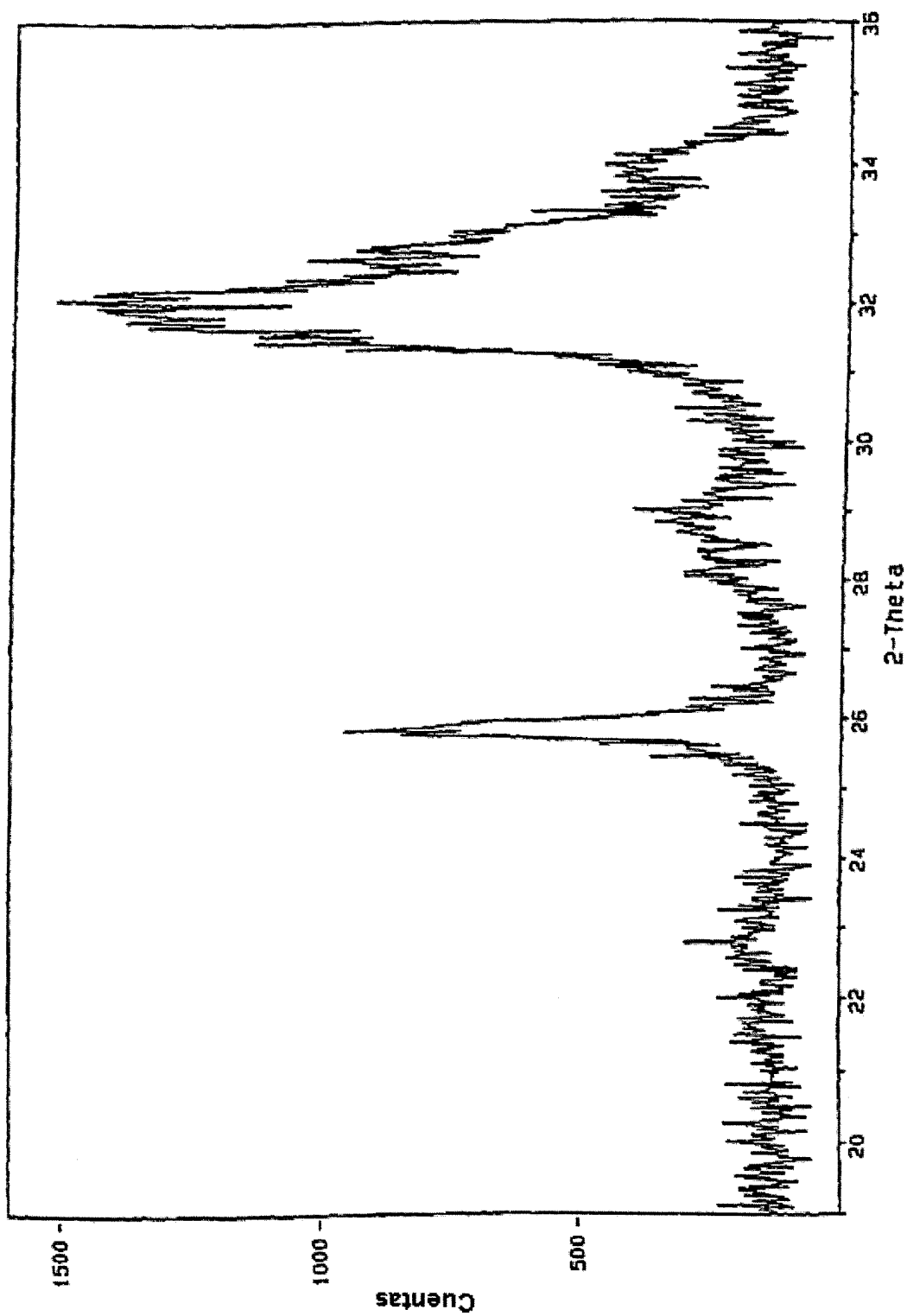


FIG. 16

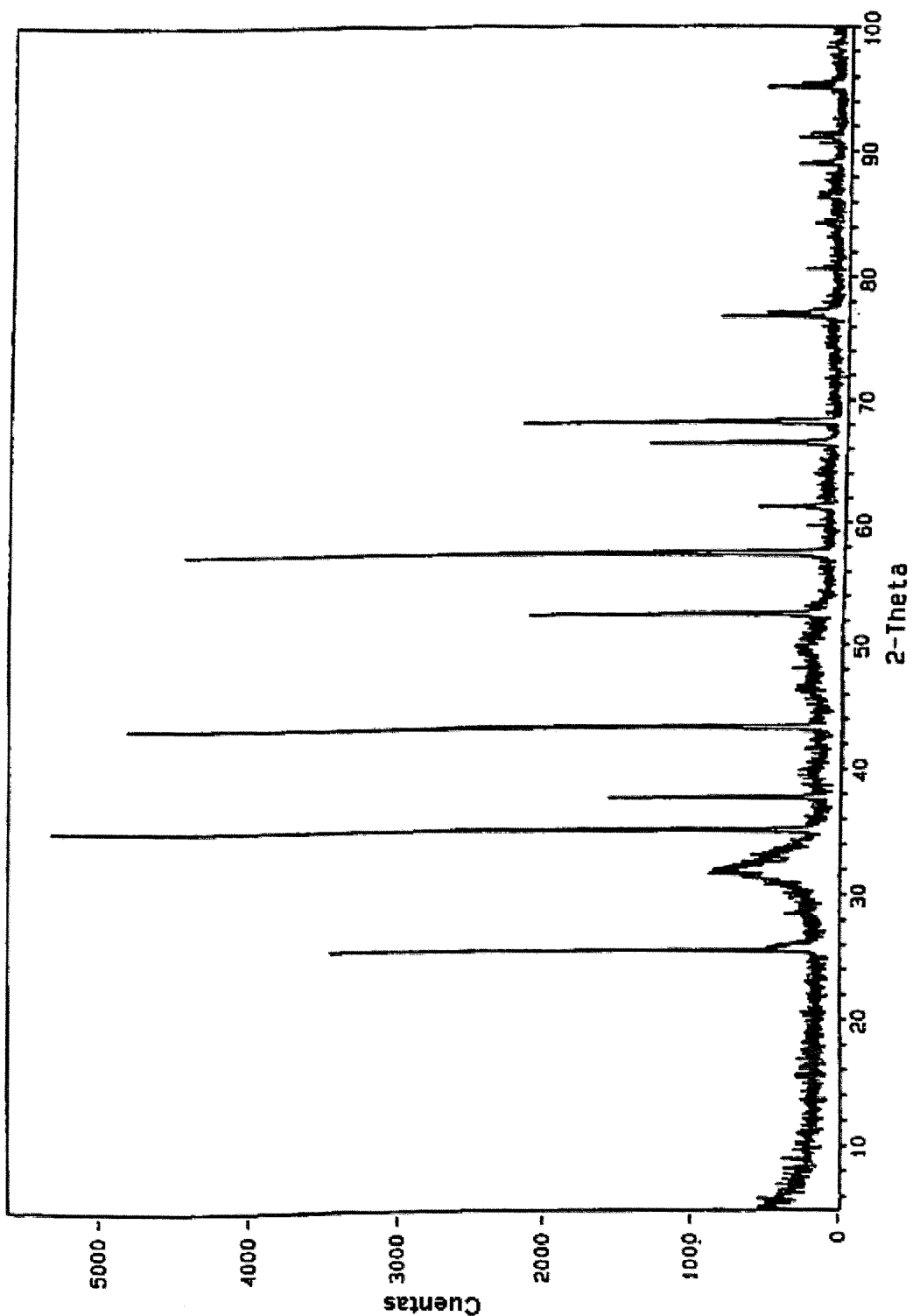
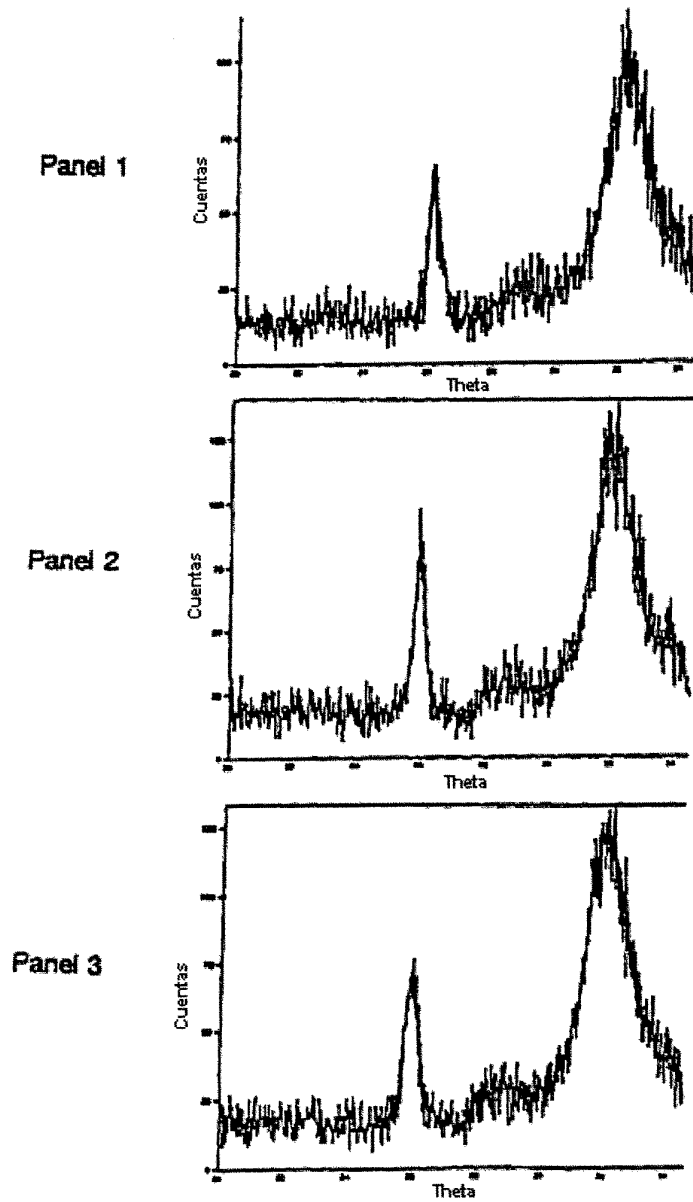


FIG. 17

ANÁLISIS DE DRX DE α -BSM™ EXPLANTADO DURANTE LOS DÍAS 4, 7, 14

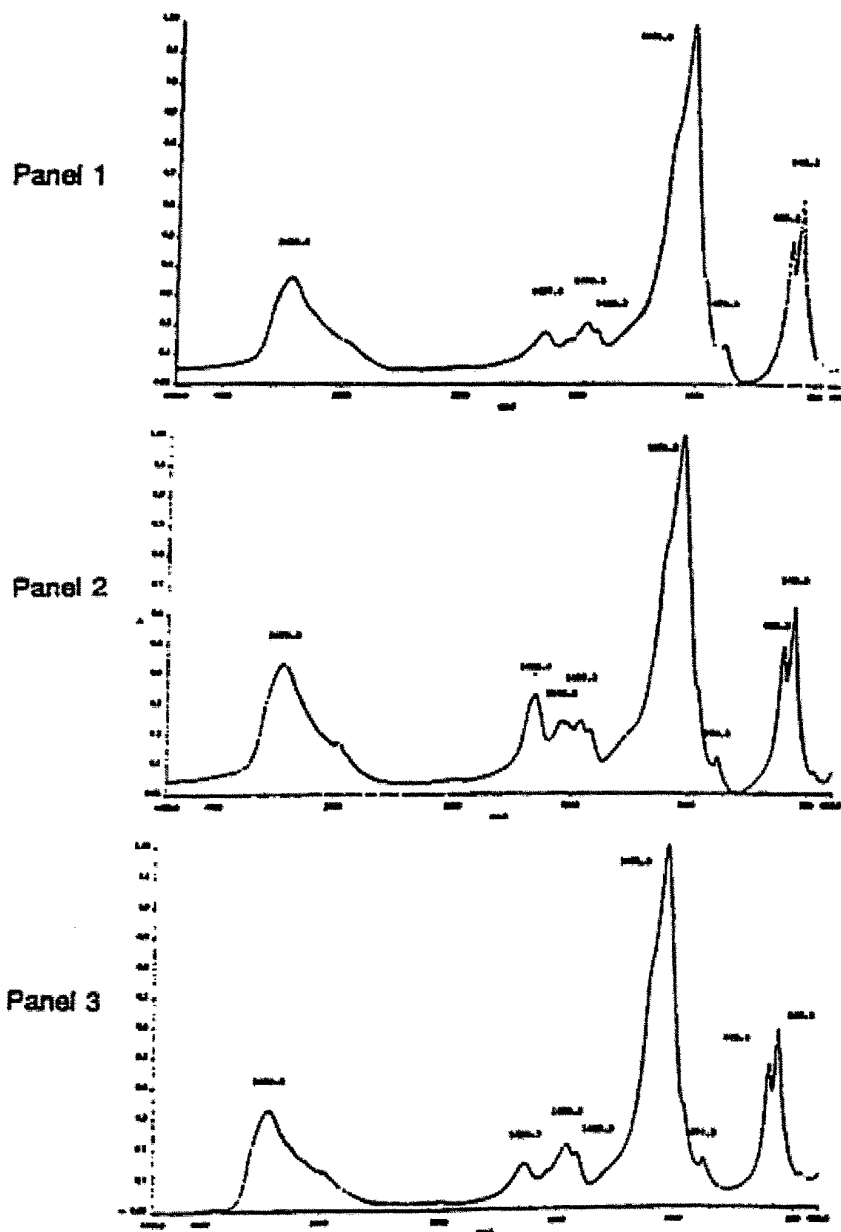


a:/Rabbit Study Kathleen Disk

A3

FIG. 18

ANÁLISIS DE FTIR DE α -BSM™ EXPLANTADO DURANTE LOS DÍAS 4, 7, 14

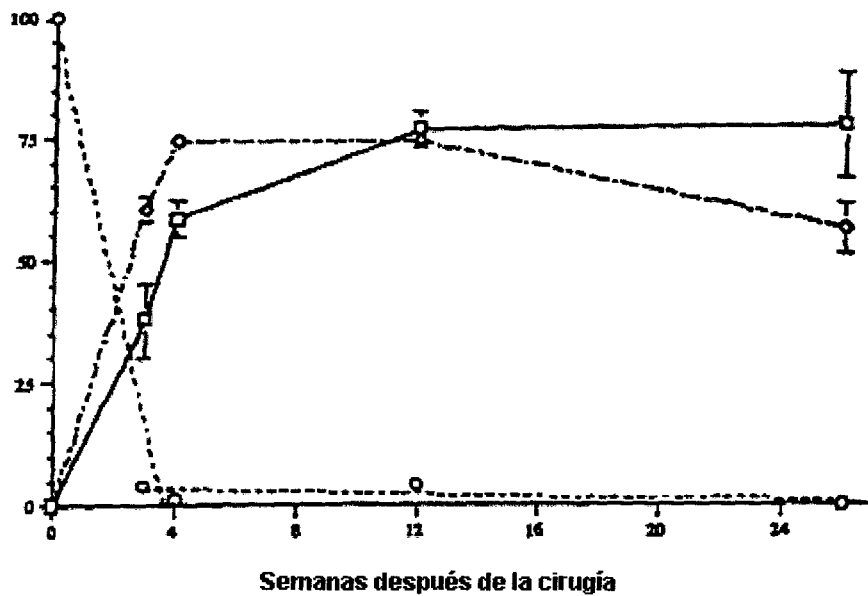


a:/Rabbit Study Kathleen Disk

A2

FIG. 19

**Reabsorción de α -BSM™ y Cicatrización del Defecto en
Comparación con la Cicatrización de un Autoinjerto**



Esta figura demuestra la reabsorción de α -BSM™ (círculos) después de su implantación en un defecto femoral canino. Se representa también la formación de hueso nuevo en el lugar del defecto de animales tratados con α -BSM™ (cuadrados) o con hueso autólogo (rombos). Los datos se presentan como % del defecto ocupado por fosfato de calcio (ya sea hueso nuevo o α -BSM™) según se determinó mediante histomorfometría con microscopía óptica de secciones sin descalcificar teñidas con von Kossa. Las barras de error representan el error estándar de la media. Para las semanas 3 y 26, n = 4; Para las semanas 4 y 12, n = 8.

FIG. 20