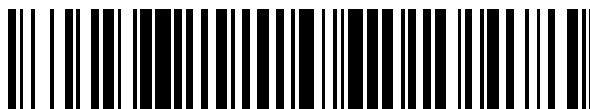


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 889**

51 Int. Cl.:

A61L 27/48 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01)
A61L 27/46 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)
A61K 6/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2005 E 10012828 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2322234**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende una pasta de endurecimiento in situ, su fabricación y uso**

30 Prioridad:

09.06.2004 EP 04013668

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2013

73 Titular/es:

**SCIL TECHNOLOGY GMBH (100.0%)
Fraunhoferstrasse 15
82152 Martinsried, DE**

72 Inventor/es:

**HELLERBRAND, KLAUS;
SIEDLER, MICHAEL;
SCHÜTZ, ANDREAS;
POMPE, CONRELIUS y
FRIESS, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 429 889 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

Composición farmacéutica que comprende una pasta de endurecimiento *in situ*, su fabricación y uso

- 5 Se desarrolló una composición farmacéutica que comprende una pasta de endurecimiento *in situ*, que contiene un plastificante soluble o miscible en agua que es un disolvente orgánico, un material de relleno insoluble en agua, orgánico o inorgánico y un polímero insoluble en agua. La pasta es una formulación inyectable y moldeable, estable que presenta, una vez endurecida *in situ*, propiedades de andamiaje. La pasta puede usarse además como sistema de administración para un agente activo en el campo de la regeneración tisular.

La adición de un material de relleno generador de poros soluble en agua como agente contra la formación de piel aumenta la formación de poros con tamaños de poro de diámetros suficientes para la infiltración celular.

- 10 La pasta endurecida es lo suficientemente estable mecánicamente como para usarse como matriz de sustitución de hueso y cartilago así como regeneración de ligamento, tensión o tratamiento de enfermedades periodontales. Todos los componentes son totalmente biocompatibles, preferiblemente biorresorbibles y certificados para la aplicación parenteral. La liberación sostenida de péptidos y proteínas puede modularse por la composición y el diseño del procedimiento.

- 15 La invención engloba una composición farmacéutica que comprende la pasta de la invención e ilustra el uso de dicha pasta para la preparación de una composición farmacéutica que va a usarse para el aumento óseo, para tratar defectos óseos, para tratar una enfermedad discal traumática y degenerativa, para tratar la dehiscencia ósea o que va a usarse para la elevación del suelo sinusal, regeneración de ligamento y tensión incluyendo reparación periodontal.

20 Antecedentes tecnológicos

- En el campo de la tecnología farmacéutica, muchos materiales diferentes se han evaluado ya y/o están todavía en el proceso de mejorarse adicionalmente para su uso como material de sustitución de hueso (injerto óseo), debido a la amplia variedad de requisitos que deben cumplir los materiales. Dependiendo de la indicación, un sustituto de injerto óseo ideal debe tener las siguientes propiedades, inicialmente moldeable y fácil de conformar y administrar, pero estable mecánicamente a lo largo del tiempo de manera similar al hueso endógeno para hacer de puente en defectos óseos, rellenar cavidades o para el aumento óseo, preferiblemente, el material debe poder producir endurecimiento *in situ* para poderse aplicar mediante aplicaciones mínimamente invasivas. El material debe ser biocompatible, preferiblemente biodegradable y biorresorbible y promover la adhesión y proliferación celular. Debe tener una porosidad interconectada para permitir el crecimiento de células para permitir una unión al tejido óseo circundante (osteoconductividad). Además, el material debe poder actuar como portador para factores de crecimiento óseo (BMP) para la liberación controlada de estas proteínas para introducir la formación de hueso (osteoinductividad). De manera ideal, la proteína dentro del material está protegida frente la degradación proteolítica y por lavado en el sitio de implantación. Finalmente, el material debe ser de origen sintético para evitar infecciones y reacciones inmunológicas, debe estar disponible en cuanto a su acceso y ser de calidad reproducible. De manera ideal, los materiales sustitutos de hueso sintético deben ser claramente visibles en exámenes radiográficos para inspeccionar el proceso de consolidación y determinar la cantidad y la masa de formación de nuevo hueso.

No obstante, hasta ahora no existe ningún material, que pueda satisfacer todos estos requisitos de un material preferible.

- 40 Debido a la necesidad médica de injertos óseos artificiales y a la disponibilidad limitada de hueso autólogo, comúnmente están en uso diferentes materiales. Los más prominentes son los fosfatos de calcio y polímeros biorresorbibles del tipo de PLGA.

Material a base de fosfatos de calcio

- 45 Diversos fosfatos de calcio tales como beta-fosfato de tricalcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (beta-TCP), alfa-fosfato de tricalcio (alfa-TCP) e hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (HA) han mostrado ser eficaces como materiales de sustitución de hueso. El beta-TCP, por ejemplo, es adecuado tanto como diversos granulados como en trozos (bloques) para el tratamiento de defectos óseos. Los materiales de sustitución de hueso que contienen fosfato de calcio se usan habitualmente cuando la regeneración del hueso ya no es posible o es posible únicamente con dificultades. Además, se usan materiales de sustitución de hueso cuando la formación de hueso adicional es un requisito previo para un ajuste posterior de un implante. Los fosfatos de calcio presentan un efecto osteoconductor, es decir representan una estructura inerte que facilita la migración de células desde el hueso vecino. La presencia de huesos o diferentes células mesenquimatosas, sin embargo, es una condición previa para la nueva formación de huesos.

- 50 La adición de astillas de hueso autólogo puede aumentar significativamente el efecto de los fosfatos de calcio. Estas astillas de huesos no son sólo osteoconductoras, sino también osteoinductivas, es decir producen la transformación de células madre mesenquimatosas no diferenciadas en osteoblastos y condrocitos. Por motivos de seguridad, se prefieren las astillas de hueso autógeno a las preparaciones alogénicas o xenogénicas. El uso de huesos autógenos, sin embargo, siempre implica un segundo procedimiento quirúrgico, lo que es incómodo para el paciente y es de

acceso limitado. Además, las biopsias de material de injerto óseo autólogo tienen varias desventajas incluyendo dolor posoperatorio y complicaciones en la recogida del injerto.

Además de los gránulos y bloques sólidos mencionados anteriormente, los cementos de fosfato de calcio (CPC) representan una enorme clase adicional de materiales a base de fosfato de calcio. Se administran mediante inyección o rascador en el defecto óseo como pasta moldeable, pueden adaptarse al sitio del defecto y se vuelven sólidos tras un periodo de tiempo (Driessens *et al.*, 2002).

Uno de los primeros CPC de autoendurecimiento consiste en fosfato de tetracalcio (TTCP) y fosfato de dicalcio anhidro (DCPA) (Chow *et al.*, 2000). Estos componentes reaccionan en presencia de agua para formar hidroxiapatita como producto final de la reacción de fraguado del cemento. Las reacciones son o bien endotérmicas o bien exotérmicas. Las reacciones exotérmicas generan suficiente calor para degenerar proteínas osteogénicas, mientras que las reacciones de fraguado endotérmicas impiden la lesión térmica en el tejido circundante.

Debido a que la hidroxiapatita se forma en un entorno acuoso, es más similar a apatitas biológicas que a hidroxiapatita formada mediante procedimientos a alta temperatura. Como consecuencia, el CPC es osteoconductor y experimenta osteointegración rápidamente (Cherng *et al.*, 1997).

Aunque los CPC parecen tener varias ventajas con respecto a los biomateriales de fosfato de calcio usados actualmente, una limitación aparente es su tiempo de endurecimiento relativamente largo asociado con el efecto de lavado explicado más adelante (Cherng *et al.*, 1997). En los últimos años, se ha desarrollado un CPC adicional que contiene alfa-fosfato de tricalcio (alfa-TCP) y carbonato de calcio (CaCO_3), fosfato de monocalcio (MCPA), fosfato de monocalcio monohidratado (MCPM), fosfato de dicalcio dihidratado (DCPD) o DCPA y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Takagi *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayor parte de los CPC disponibles comercialmente desarrollados en los últimos años tienen alfa-TCP como el reactante principal con diferentes tamaños de partícula de la fase de polvo inicial. Los productos disponibles comercialmente incluyen Biobon® (α -BSM), Biocement D y H, Biofill®, Bonesource®, Calcibon®, Cementek®, Mimics Biopex® y Norian® SRS® (Driessens *et al.*, 2002).

El alfa-BSM (ETEX Corporation, Cambridge, MA) se compone principalmente de dos fosfatos de calcio, el primero un fosfato de calcio amorfo (ACP) con una razón Ca/P de 1,54, el segundo un fosfato de dicalcio dihidratado (DCPD, o brushita). El material es un sustituto de hueso inyectable que se endurece a la temperatura corporal (37°C) en el plazo de aproximadamente 20 minutos tras mezclarse con agua o una solución salina, formando una fase de hidroxiapatita escasamente cristalina.

Otra pasta de CPC es el Norian® SRS® (sistema de reparación esquelética), que es un cemento de apatita carbonatada de endurecimiento rápido, inyectable usado para rellenar defectos en zonas de hueso esponjoso comprometido durante la restauración o el aumento del esqueleto. El Norian SRS se endurece para formar dahllita, que reproduce estrechamente la fase mineral del hueso y gradualmente se remodela en hueso en el organismo mediante resorción osteoclástica y nueva formación de hueso. Es necesario premezclar este CPC en un aparato adoptado especial antes de la aplicación.

La mayor parte de estas formulaciones de CPC disponibles se componen de dos componentes que reaccionan y se endurecen cuando se mezclan (Seeherman *et al.*, 2002). Se mezclan los componentes de polvo con una disolución acuosa, incluyendo algunos un acelerador o promotor (por ejemplo, hidrogenofosfato de disodio, Na_2HPO_4) inmediatamente antes de la aplicación. Este procedimiento de premezcla produce desviaciones en la calidad del producto final, dependiendo de la manipulación antes de su uso, por ejemplo, suspensión inhomogénea. Por tanto este procedimiento de premezclado puede conducir a una disminución de la estabilidad mecánica del implante y, por tanto, a dificultades referentes a la reproducibilidad.

Otra limitación de estas formulaciones es que si el polvo se mezcla con el componente acuoso, la mezcla comienza a solidificar, por tanto el intervalo temporal en que puede administrarse el cemento está limitado únicamente a unos pocos minutos. En la situación clínica, el cirujano ha de mezclar apropiadamente el cemento y luego colocar la pasta de cemento en el defecto en el plazo de tiempo prescrito, lo que es un factor crucial en la consecución de resultados óptimos.

Una pasta de CPC premezclada, que es estable en la jeringa y sólo se endurece tras exponerse a agua contiene polvos de TTCP más DCPA y glicerol como líquido de cemento. Sin embargo, la pasta de CPC-glicerol no tuvo una buena resistencia al lavado cuando se aplicó a un campo abierto húmedo (Takagi *et al.*, 2003).

Este efecto de lavado surge cuando la pasta de CPC entra en contacto con fluidos fisiológicos o cuando se produce hemorragia debido a su dificultad en algunos casos para lograr la hemostasia. También se ha encontrado que tales pastas a menudo se disgregan parcial o completamente o presentan un comportamiento inhomogéneo tan pronto como entran en contacto con fluidos corporales u otras disoluciones acuosas (documento US 6.206.957 y la bibliografía en el mismo). Además, tales pastas se separan fácilmente durante la extrusión a partir de jeringas, forzándose la mayor parte de líquido fuera de la jeringa mientras que las partes más sólidas permanecen en la jeringa y no pueden retirarse de la misma, ni siquiera por medio de mayor presión. Como resultado de una separación, puede obtenerse por tanto un material que ya no es adecuado para el fin pretendido.

Se han realizado varios intentos en el pasado para mejorar las características de los CPC. Cherng *et al.* añadieron hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC) y quitosano a los líquidos de cemento (Cherng *et al.*, 1997) para mejorar las propiedades de manipulación de los CPC. Sin embargo, se retardó el tiempo de endurecimiento mediante la adición de HPMC y CMC, y se debilitó la resistencia mecánica mediante la adición de o bien lactato de quitosano o bien acetato de quitosano. Se han realizado otros intentos para mejorar la inyectabilidad de los CPC mediante, por ejemplo, un aumento en la razón de líquido con respecto a polvo, la adición de iones citrato y la adición de fármacos poliméricos al componente líquido (Bohner y Baroud, 2004). Sin embargo, ninguna de estas mejoras dio como resultado una pasta de CPC premezclada estable.

Otro problema importante de los CPC es que presentan sólo microporos con tamaños de poro de por debajo del micrómetro a unos pocos micrómetros. Estudios previos con implantes de hidroxiapatita han mostrado que se requiere un tamaño de poro de aproximadamente 100 µm a varios cientos de µm (macroporos) para el crecimiento de hueso (del Real *et al.*, 2002). Los macroporos han mostrado ser beneficiosos para facilitar la infiltración celular y el crecimiento de tejido. Sin embargo, la macroporosidad siempre da como resultado una disminución significativa en la resistencia mecánica (Chow, 2000).

Otros grupos trataron de mejorar el comportamiento de resorción de los CPC, por ejemplo, aumentando la porosidad del material (del Real *et al.*, 2002). Los experimentos más extensos se han realizado mezclando los CPC con cristales de las dimensiones correctas de compuestos altamente solubles y no tóxicos, tales como manitol o sacarosa. La desventaja es que la porosidad no puede crearse durante el endurecimiento del cemento en el entorno *in vivo*. La adición de sacarosa o manitol requiere la disolución de estos componentes tras la aplicación y el endurecimiento del cemento en el defecto óseo para lograr macroporosidad. Otro método consiste en la adición de NaHCO₃ al polvo de cemento inicial y el uso de dos líquidos diferentes para crear macroporos (del Real *et al.*, 2002).

Se intentó un aumento en la resistencia de los CPC a la vez que se formaban macroporos usando, por ejemplo, cristales de manitol o fibras de aramida (Xu *et al.*, 2001). También se encontró que la incorporación de quitosano, un biopolímero natural, aumentaba la resistencia de los CPC, sin embargo, no se generaron macroporos en los CPC que contenían quitosano (Takagi *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2002).

En general, los CPC experimentan una estabilidad mecánica relativamente baja (por ejemplo, resistencia a la compresión, fragilidad) y falta de macroporosidad, por ejemplo, osteoconductividad, lo que limita su aplicabilidad en ortopedia sólo a aplicaciones sin soporte de carga. Las diferentes reacciones del cemento provocan que la hidroxiapatita forme estados de cristalinidad variables que dan como resultado una alteración del tiempo de resorción. Debido a la falta de macroporosidad y, por tanto, osteoconductividad, muchas de las formulaciones de cemento son malos portadores para factores de crecimiento osteogénicos.

Se han realizado intentos adicionales para mejorar los CPC añadiendo micropartículas de polímeros biodegradables (por ejemplo, poli(ácido DL-láctico-co-glicólico, PLGA) como vehículos de administración para moléculas bioactivas (Ruhe *et al.*, 2003). Se añadieron micropartículas de proteína-PLGA al polvo de CPC y se usó una disolución acuosa de Na₂HPO₄ como líquido, que se añadió a la composición poco antes de la aplicación.

Se acepta generalmente que el CPC necesita una mejora adicional para ampliar sus posibles aplicaciones clínicas. Sin embargo, la mejora adicional de las propiedades de materiales debe tener en cuenta la manera en que los cirujanos aplican los cementos óseos a través de técnicas de cirugía mínimamente invasivas (MIST (*minimal invasive surgery techniques*) citadas en Bohner, 2001). En este sentido, debe considerarse la mejora de materiales adicional en el equilibrio entre lo que se considera, para una determinada aplicación clínica, la inyectabilidad de cemento óptima, un comportamiento de fraguado rápido, macroporosidad y resistencia mecánica.

Recientemente, estos sistemas de CPC se han vuelto interesantes especialmente en combinación con proteínas morfogenéticas óseas (Seeherman *et al.*, 2003).

Material a base de PLGA sintético

Otra clase importante de biomateriales, que desempeña un papel predominante en el campo de la ingeniería tisular ósea, son los polímeros biorresorbibles (Vert, 1989). Especialmente, la clase de compuestos de los poli(hidroxiácidos) tiene perspectivas de aplicación interesantes debido a su biodegradabilidad intrínseca. Estos materiales de los que el poli(ácido glicólico) (PGA) y poli(ácido láctico) (PLA) son los más prominentes experimentan escisión de cadena hidrolítica (degradación) en un entorno húmedo. La degradación sostenida conduce finalmente a las unidades de hidroxiácido correspondientes. La mayor parte de estos productos finales hidrolíticos se producen como metabolitos de muchas bacterias y fenotipos celulares.

El potencial de degradación y sus propiedades mecánicas ofrecen aplicaciones para el uso como sustratos para implantes temporales en la tecnología médica. Estudios para diversos polímeros en diferentes tejidos documentan la biocompatibilidad de estos compuestos *in vivo*, lo que forma las bases para el desarrollo de implantes comerciales como dispositivos médicos (Middleton *et al.*, 2000).

En la cirugía clínica, los poliésteres desempeñan presumiblemente el papel más importante en relación con la fijación, el aumento y la sustitución de hueso. Dispositivos como tornillos, placas, anclajes o pasadores sirven para la

colocación y fijación de fragmentos de hueso tras la pérdida o el daño óseo. La principal característica de estos polímeros absorbibles en aplicación es la falta de necesidad de una operación de retirada. Otro punto importante está a favor de los dispositivos de fijación poliméricos: la integración mecánica del implante en el tejido óseo.

Un inconveniente importante en los implantes totalmente a base de poliéster es la posible acumulación de productos de degradación que alcanzan niveles citotóxicos y la acidificación acompañante en el sitio del implante debido a la liberación que disminuye el pH de monómeros de ácido, especialmente cuando se usaron implantes no porosos, sólidos, y la degradación avanza según un mecanismo de degradación volumétrica (Li *et al.*, 1990).

Para evitar tales consecuencias negativas provocadas por la disminución del pH local, el implante debe presentar porosidad por ejemplo, mediante el procedimiento de lixiviación de sal para evitar la degradación volumétrica y, por tanto, una acumulación de monómeros ácidos y reducir la cantidad neta del polímero. Además, se ha sugerido incorporar sales básicas dentro de los implantes de PLA/PGA (Agrawal *et al.*, 1997). Otros enfoques emplean cerámicas básicas como fosfatos de calcio como materiales de relleno para poliésteres para equilibrar el valor de pH local y aumentar la estabilidad mecánica (Schiller *et al.*, 2003). También se han producido materiales compuestos de hidroxiapatita y PLA/PLGA (polilactida-co-glicolida) (Durucan *et al.*, 2000). El procesamiento de tales materiales compuestos requiere un tratamiento térmico y el uso de disoluciones en cloroformo del componente polimérico (Ignjatovic *et al.*, 1999). Como alternativa, pueden usarse polímeros con mayor estabilidad hidrolítica como poli(ácido hidroxibutírico).

Para el uso de estos polímeros como sustitutos de hueso, la estrategia común es diseñar un implante, que satisface temporalmente la función para permitir un proceso de consolidación y retener la resistencia durante las fases tempranas en el sitio de implantación tras la operación. Después, la pérdida de resistencia y el módulo del implante deben estar en armonía con la resistencia creciente del tejido lesionado (Tormälä *et al.*, 1995). El avance de la degradación crea espacio para procesos de restauración para rellenar el hueco con el crecimiento de tejido de huésped vital. En la actualidad, no se dispone de ningún material de relleno que se ajuste a este requisito de manera satisfactoria para formar nuevo hueso homogéneo en grandes defectos (Rueger *et al.*, 1996).

Biomateriales y proteínas osteoinductivas

Para lograr un efecto osteoinductivo, una alternativa al uso de huesos autógenos es el uso de factores de diferenciación y crecimiento óseo específicos tales como GDF-5 o diferentes proteínas morfogenéticas óseas (BMP). Numerosos estudios con animales muestran claramente que este efecto osteoinductivo puede aumentar mucho si estos factores proteicos se combinan con un portador que desacelere la liberación de proteínas y, por tanto, aumente el tiempo de residencia eficaz de la proteína en el sitio del defecto y finalmente acelere la consolidación ósea en comparación con tampones de formulaciones líquidas. (Seeherman *et al.*, 2003). En la bibliografía, se describen como portadores fosfatos de calcio, colágeno, colágeno mineralizado (fosfato de calcio que contiene colágeno) y polímeros biorresorbibles, hidroxiapatita y beta-TCP (Hotz *et al.*, 1994), apatita hidroxiálica de extractos de algas (Gao *et al.*, 1996), extractos óseos (Gombotz *et al.*, 1996), colágeno (Friess *et al.*, 1999) y poli(alfa-hidroxi)ácidos (Hollinger *et al.*, 1996).

Los análisis de la potencia de los portadores recubiertos, que se describen en la bibliografía, no presentan una imagen uniforme sino que muestran variaciones significativas que son una consecuencia de o bien el tipo de portador seleccionado o bien el método de recubrimiento (Terheyden *et al.*, 1997). Se describen diversos métodos.

En el documento WO 98/21972, la disolución en primer lugar de GDF-5 en un disolvente orgánico y luego su precipitación añadiendo agua consiguen el recubrimiento mediante la precipitación rápida de GDF-5 sobre beta-TCP. Debido a la toxicidad de muchos disolventes, sin embargo, no se prefiere un procedimiento de este tipo para la producción de composiciones farmacéuticas. Lind *et al.* (1996) llevan a cabo el recubrimiento de diversas cerámicas de fosfato de calcio en presencia de gelatina (obtenida habitualmente a partir de huesos de bovinos o cerdos) como proteína de protección. Debido al aumento del riesgo de infección y de reacciones inmunogénicas, sin embargo, debe evitarse el uso de sustancias animales para la producción de composiciones farmacéuticas y especialidades farmacéuticas. Friess *et al.* (1999) y Gao *et al.* (1996) describen el recubrimiento de colágenos con BMP-2. Debido a la baja resistencia a la compresión de los colágenos, tales portadores, sin embargo, no son adecuados para muchas indicaciones. Esto se aplica particularmente a indicaciones con las que el hueso recién formado ha de sostener una carga de presión posterior. Además, las calidades farmacéuticas de colágeno están disponibles hasta la fecha a partir de fuentes animales únicamente. Finalmente, según la rápida tasa de degradación y liberación de los factores de crecimiento en los productos del estado de la técnica (por ejemplo, rhBMP-2 y esponja de colágeno) el contenido en principio activo está a menudo drásticamente por encima del nivel fisiológico en el tejido óseo.

Ventajosamente, tal como se da a conocer en el documento WO 03/043673, los presentes inventores han encontrado que se logran propiedades osteoinductivas y osteoconductoras mejoradas y fiables *in vivo* tras la implantación en un sujeto, preferiblemente un ser humano, en un dispositivo en el que puede realizarse una distribución homogénea del portador de material compuesto, tal como beta-TCP u otros fosfatos de calcio, con proteína osteoinductiva no agregada, biológicamente activa. Tal agregación provoca microprecipitación, que es el motivo para una distribución inhomogénea que da como resultado propiedades osteoinductivas disminuidas al menos significativamente tal como se describe para otros dispositivos en la técnica anterior, por ejemplo, en el

documento WO98/21972. Además, se ha encontrado que pueden evitarse efectos secundarios no deseados, tales como inflamación y reacciones tóxicas del sujeto tras la implantación mediante el dispositivo del documento WO 03/043673, que está libre de impurezas tóxicas o contaminantes infecciosos. En particular, el uso de proteínas protectoras (tales como, por ejemplo, gelatina) como mediador de solubilidad es totalmente innecesario para el dispositivo del documento WO 03/043673. Sin embargo, tales dispositivos no son adecuados para aplicaciones que requieren una liberación retardada del agente activo.

En el campo del aumento óseo, los sistemas de liberación retardada se requieren especialmente en vista de la corta semivida de proteínas o péptidos en el cuerpo humano con respecto a la inducción ósea, o bien debido a la dispersión desde el sitio del implante o bien a través de degradación. En los primeros intentos para lograr una liberación retardada de proteínas morfogenéticas óseas, se han dado a conocer dispositivos en los que tales proteínas se han combinado con polímeros biorresorbibles. Hollinger *et al.* (1996) publicaron el uso de poli(alfa-hidroxiácidos) como portadores para BMP-2. En combinación con proteínas o péptidos osteogénicos, estos polímeros son de especial interés con respecto a lograr una liberación controlada del agente activo. Wang *et al.* (2000) dan a conocer un procedimiento de liofilización de emulsión que parte de una disolución de PLA en cloruro de metileno para la fabricación de un andamiaje biodegradable que puede incorporar y administrar macromoléculas bioactivas para la regeneración ósea. Schmidmaier *et al.* (2000) dan a conocer el uso de una disolución en cloroformo de PLA junto con los factores osteoinductivos IGF-I y TGF-beta1 en los implantes de recubrimiento.

El documento WO02/070029 da a conocer una matriz de beta-TCP porosa que se mezcla opcionalmente con microesferas de PLGA encapsuladas con OP-1 (proteína osteogénica 1, una proteína morfogenética ósea) para formar un material heterogéneo. A diferencia del documento WO 03/043673, la matriz de beta-TCP en el documento WO02/070029 presenta vacíos separados individuales en vez de poros interconectados. Los poros de esta matriz no pueden dotarse de un recubrimiento homogéneo del polímero y/o componente de agente activo. Las microesferas las produce Alkermes, Inc y presentan un diámetro de 20 a 500 µm que permite la microagregación del agente activo encapsulado. Para la producción de tales microesferas, se pulverizan disoluciones en cloruro de metileno del componente polimérico junto con la proteína y se congelan en un etanol sumamente frío (Herbert *et al.*, 1998 y véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.726.860), ambas etapas en combinación con dos disolventes orgánicos diferentes que confieren esfuerzo químico y mecánico a la proteína.

Sistemas de administración a base de polímeros biodegradables fluidos

La colocación de dispositivos médicos tales como implantes y otros artículos sólidos en un organismo implica frecuentemente un procedimiento quirúrgico. Para algunas aplicaciones, por ejemplo, administración de fármacos o mínimamente invasivas, sin embargo, se ha descrito que los sistemas de administración a base de polímeros biodegradables pueden introducirse en un organismo como formulaciones fluidas similares a los cementos de fosfato de calcio (véanse, por ejemplo, los documentos EP0436667, EP0537559, EP0539751, EP0754032, EP0862416, EP1126822, EP1147781, EP1404294, US 6.461.631, US 5.780.044 y US 5.278.202, así como homólogos extranjeros, cedidos a Atrix Laboratories, Inc.).

A diferencia del CPC también fluido, en el que la proteína está dentro de, o sobre, el portador en contacto directo con el medio circundante, puede protegerse y/o estabilizarse una proteína dentro de un portador que contiene polímero (por ejemplo, poli(alfa-hidroxiácidos). Además, la proteína o el péptido se libera sólo por difusión desde el cemento de fosfato de calcio mientras que la proteína o el péptido dentro de la matriz de polímero se libera con la degradación creciente del polímero y/o por difusión desde la matriz de polímero. Por tanto, la cinética de liberación puede ajustarse con precisión más fácilmente que lo que es el caso para el cemento de fosfato de calcio puro.

Estas composiciones comprenden un polímero biodegradable insoluble en agua en un disolvente orgánico miscible en agua biocompatible para formar un implante sólido biodegradable *in situ* dentro del organismo mediante exposición a fluidos corporales o un fluido acuoso y se administran como líquidos usando una jeringa para formar *in situ* una matriz sólida mediante la disipación o dispersión del disolvente orgánico dentro del organismo. Durante el contacto con agua, se forma un andamiaje con una estructura de núcleo interno altamente porosa rodeada por una superficie casi no porosa.

Esta superficie no porosa inhibe la migración celular al interior del núcleo interno, por tanto, estos materiales no presentan propiedades osteoconductoras. Estos implantes se usan como dispositivos protésicos y/o sistema de administración controlada para agentes activos biológicos.

Otro inconveniente de este tipo de clase de materiales en el tiempo de endurecimiento prolongado hasta que el material muestra una estabilidad mecánica suficiente. Sin embargo, la degradación posterior *in vivo* del polímero provoca problemas similares a los descritos anteriormente para los andamiajes a base de polímero convencionales. Presentan degradación, lo que conduce a una pérdida en las propiedades mecánicas, y una disminución del pH local hasta un nivel citotóxico. Como consecuencia, esto puede conducir a una respuesta inflamatoria por cuerpo extraño.

Además, no tienen las mismas propiedades bioactivas y osteoconductoras de los sistemas de fosfato de calcio descritos anteriormente.

Por tanto, existe la necesidad de una composición inyectable y biocompatible mejorada, que proporcione un

andamiaje poroso de interconexión *in vivo* para la infiltración y migración celular con un comportamiento de endurecimiento acelerado para sustituir el biomaterial por estructuras óseas a la vez que se reduce la carga (contenido en polímero) para el organismo.

5 Otro objeto subyacente a la presente invención es tener una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* con una buena resistencia al lavado que es estable en su envase y se endurece sólo tras colocarse en el defecto con tiempo suficiente para ajustar la forma del material al tamaño del defecto, si es necesario.

10 Otro objeto de la presente invención es la provisión de una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* adecuada para la implantación en un sujeto que necesita un aumento óseo mediante una composición que puede formar un andamiaje macroporoso en la totalidad de la superficie y el interior del andamiaje tras colocarse en el defecto.

15 Otro objeto subyacente a la presente invención es la provisión de una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* adecuada para la implantación en un sujeto que necesita un aumento óseo con una resistencia mecánica suficiente y/o evitar los problemas asociados con una disminución de pH local inducida por la degradación del polímero.

Otro objeto subyacente a la presente invención es la provisión de una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* adecuada para la implantación en un sujeto que necesita un aumento óseo mediante inyección, moldeo, relleno o presión. *In situ* la pasta con un agente activo permitirá la liberación retardada de un agente activo unido a la matriz, preferiblemente con una actividad local optimizada de dicho agente activo.

20 Otro objeto subyacente a la presente invención es la provisión de una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* adecuada para la implantación en un sujeto que necesita un aumento óseo mediante inyección que permite la liberación retardada de un agente activo unido y evitar los problemas asociados con una disminución de pH local inducida por la degradación del polímero.

25 Otro objeto subyacente a la presente invención es la provisión de una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* adecuada para la implantación en un sujeto que necesita un aumento óseo mediante inyección que permite la liberación retardada de un agente activo unido y evitar efectos secundarios tóxicos y/o respuestas inflamatorias.

30 Otro objeto subyacente a la presente invención es la provisión de una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* adecuada para la implantación en un sujeto que necesita un aumento óseo mediante inyección que permite la liberación retardada de un agente activo unido y que permite menores dosis del agente activo en comparación con dispositivos convencionales.

35 Otro objeto subyacente a la presente invención es la provisión de una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* adecuada para la implantación en un sujeto que necesita hueso que permite la liberación retardada de un agente activo unido mediante inyección, pudiendo formar la pasta un andamiaje poroso y estable mecánicamente para el relleno de defectos de hueso y cartílago.

Otro objeto subyacente a la presente invención es la provisión de una composición que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* adecuada para la implantación en un sujeto que necesita hueso que permite la liberación retardada de un agente activo unido mediante inyección, endureciéndose la pasta en condiciones fisiológicas y pudiendo sustituir dispositivos convencionales implantados mediante cirugía.

40 Sumario de la invención

Sorprendentemente, los presentes inventores pudieron proporcionar una composición farmacéutica que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* que resuelve estos objetos.

45 Con ello, los presentes inventores proporcionan una composición farmacéutica que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* que comprende un plastificante, un polímero insoluble en agua y un material de relleno sólido insoluble en agua, siendo la pasta una pasta premezclada estable que se endurece tras el contacto con un líquido acuoso tal como agua, una solución fisiológica, medio de cultivo celular (por ejemplo, FCS) o fluido corporal y presenta una resistencia mecánica y resistencia al lavado mejoradas en el sitio del implante, incluso si se implanta en un campo abierto húmedo, a la vez que se reduce la carga de alto contenido en polímero para el organismo tal como seres humanos o animales. Además, la pasta de endurecimiento *in situ* comprende un plastificante, un polímero insoluble en agua, material de relleno sólido insoluble en agua y material de relleno generador de poros soluble en agua con macroporosidad mejorada.

50 La alta resistencia mecánica así como la porosidad, preferiblemente macroporosidad con tamaño de poro de aproximadamente 100 μm y más y la formación de un andamiaje poroso de interconexión que es suficiente para el crecimiento de células vivas, soportan la nueva formación de hueso en el vacío relleno con la composición.

Las realizaciones de la invención son:

1. Una composición farmacéutica que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* que comprende:

un plastificante, que es un líquido orgánico biocompatible soluble en agua o miscible en agua,

un polímero insoluble en agua, que es biocompatible, biodegradable, y/o biorresorbible y soluble en el plastificante,

5 un material de relleno sólido insoluble en agua, que es insoluble en el plastificante,

en la que la pasta, que es inyectable y estable en su envase, es capaz de endurecerse *in situ* para formar un implante sólido tras el contacto con el medio acuoso o fluido corporal,

10 en la que dicho plastificante es polietilenglicol (PEG) 400, PEG 200, PEG 300, PEG 600, 1,3-butanodiol, aceite de ricino, N-metil-2-pirrolidona, 2-pirrolidona, alcoholes C2 a C6, propilenglicol, solcetal, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, lactato de etilo, metil etil cetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilsulfona, tetrahidrofurano, caprolactama, decilmetsulfóxido, ácido oleico, carbonato de propileno, triacetina, N,N-dietil-m-toluidina, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona o mezclas de los mismos.

15 2. La composición farmacéutica según la realización 1, en la que el polímero insoluble en agua es poli(alfa-hidroxiácidos), poli(ortoésteres), poli(anhídridos), poli(aminoácidos), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLLA), poli(D,L)-ácido láctico (PDLLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), copolímeros de poli(ácido láctico-co-glicólico)-polietilenglicol (PLGA-PEG), poli(ácido 3-hidroxibutírico) (P(3-HB)), poli(ácido 3-hidroxivalérico) P(3-HV), poli(p-dioxanona) (PDS), poli(épsilon-caprolactona) (PCL), polianhídrido (PA) poliortoéster, polietileno (PE), polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), poliglactina, poliamida (PA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(metacrilato de hidroximetilo) (PHEMA), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poli(alcohol vinílico) (PVA), politetrafluoretileno (PTFE), polieterecetona (PEEK), polisulfona (PSU), polivinilpirrolidona, poliuretano, polisiloxano, o copolímeros, terpolímeros, copolímeros de bloque, combinaciones o mezclas de los mismos.

20 3. La composición farmacéutica según las realizaciones 1 a 2, que comprende además una cantidad eficaz de un material de relleno generador de poros soluble en agua.

25 4. La composición farmacéutica según la realización 3, en la que el material de relleno generador de poros soluble en agua comprende uno o más de un

agente de hinchamiento, preferiblemente derivados de celulosa;

tensioactivo, preferiblemente copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno; o

30 agente porógeno tal como trehalosa, manitol, sacarosa, sorbitol, aminoácidos fisiológicos, por ejemplo glicina, glutamina, arginina, citrato de sodio, succinato de sodio y fosfatos de sodio, cloruro de sodio, polivinilpirrolidona (PVP), PEG sólidos tales como PEG 4000, PEG 10000, hidrogenocarbonato de sodio, sulfato de calcio o quitosano; o

gas o agente de formación de gas tal como carbonato de calcio o hidrogenocarbonato de sodio.

35 5. La composición farmacéutica según las realizaciones 3 y 4, en la que el material de relleno generador de poros soluble en agua comprende alginato de sodio, amilasa, amilopectina, almidón, ácido hialurónico, hialuronato de sodio, gelatina, colágeno, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, sal de calcio de carboximetilcelulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxil-etilcelulosa, hidroxietilcelulosa o metilhidroxietilcelulosa.

6. La composición farmacéutica de la realización 1, en la que el material de relleno sólido insoluble en agua es

(a) un compuesto inorgánico,

(b) un compuesto orgánico.

40 7. La composición farmacéutica de la realización 1, que comprende además un agente activo, siendo dicho agente activo

(a) BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15 o BMP-16,

(b) GDF-1, GDF-2, GDF-3, GDF-4, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10 o GDF-11

45 (c) CD-RAP.

8. Una composición farmacéutica según cualquiera de las realizaciones 1 a 7, para su uso en

(a) rellenar cavidades

- (b) soportar la regeneración tisular guiada en periodontología,
- (c) tratar una enfermedad discal traumática o degenerativa,
- (d) artrodesis vertebral
- (e) tratar una fractura del cuerpo vertebral,

- 5 (f) vertebroplastia o
- (g) cifoplastia.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la influencia de los componentes de la pasta de endurecimiento *in situ* en referencia a sus características de consistencia, porosidad y endurecimiento dependiendo de su razón.

- 10 La figura 2 muestra diversas composiciones de andamiaje de formación *in situ* (IFS, *in situ forming scaffold*) o composiciones candidatas para la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención con una variación de la razón de polímero y cemento de fosfato de calcio y la dureza [%] de las diferentes composiciones en tres puntos de tiempo diferentes (tras 1, 9 y 24 días).

negro: polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (55,5% en peso)

- 15 gris oscuro: PLGA RG 503H (11,0% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (44,5% en peso)

gris brillante: PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

- 20 blanco: PLGA RG 503H (38,8% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (16,7% en peso)

blanco con puntos grises: PLGA RG 503H (38,9% en peso), polietilenglicol 400 (61,2% en peso)

gris con puntos blancos: cemento de fosfato de calcio (control)

El cemento de fosfato de calcio se compone de α -TCP (59,0% en peso), CaHPO_4 (24,0% en peso), CaCO_3 (8,5% en peso), hidroxiapatita (8,5% en peso)

- 25 La figura 3 muestra la dureza [%] de diversas composición de IFS con una razón de polímero con respecto a fosfato de calcio diferente en función del tiempo (tras 1, 72, y 168 h), en la que 0 es el punto de tiempo en el que la muestra de IFS se transfirió a un tampón PBS a 37°C y se determinó la dureza según los ejemplos descritos a continuación. La composición del cemento de fosfato de calcio usado se describe bajo la figura 6.

- 30 negro: PLGA RG 503H (19,4% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (36,1% en peso)

gris: PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

blanco: PLGA RG 503H (25,0% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (30,5% en peso)

- 35 La figura 4 muestra la dureza [%] para composiciones de IFS con diferente contenido de polietilenglicol 400 (PEG 400) como plastificante. La composición del cemento de fosfato de calcio usado se describe bajo la figura 6.

negro: PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

- 40 gris: PLGA RG 503H (20,0% en peso), polietilenglicol 400 (50,0% en peso), cemento de fosfato de calcio (30,0% en peso)

blanco: PLGA RG 503H (16,0% en peso), polietilenglicol 400 (60,0% en peso), cemento de fosfato de calcio (24,0% en peso)

- 45 Las figuras 2 a 4 muestran cómo afectan la composición, por ejemplo la razón de polímero/material de relleno inorgánico y el contenido en disolvente orgánico a las propiedades mecánicas de la pasta de endurecimiento *in situ* de la invención. Se observó la mayor estabilidad mecánica dentro de estos ejemplos para la razón de material de relleno inorgánico/polímero de 1,5:1. Se describieron anteriormente realizaciones preferidas que satisfacen los

requisitos de estabilidad de la presente invención. A continuación se describen detalles adicionales.

En la figura 4 se muestran resultados experimentales para evaluar el contenido en plastificante óptimo de la composición para lograr una máxima estabilidad mecánica. Dentro del intervalo entre el 44,5% y menor que el 60%, pudo lograrse una estabilidad mecánica mejorada en estas muestras analizadas.

- 5 La figura 5 muestra el impacto de cemento de fosfato de calcio (CPC, negro) frente a β -TCP (blanco) como fase inorgánica sobre la dureza [%] del IFS en función del tiempo. La composición del cemento de fosfato de calcio usado se describe bajo la figura 6.

negro: PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

- 10 blanco PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), β -fosfato de tricalcio (33,3% en peso)

La figura 6 muestra la dureza [%] para diversas composiciones que contienen fosfato de calcio en función del tiempo (1, 48, 168 h).

- 15 Cada formulación comprende PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso) y un componente inorgánico (33,3% en peso). El componente inorgánico de las diferentes formulaciones se usó tal como sigue:

negro: cemento de fosfato de calcio que consiste en α -TCP (62,5% en peso), CaHPO_4 (26,8% en peso), CaCO_3 (8,9% en peso), hidroxiapatita (1,8% en peso)

gris: α -TCP

blanco: α -TCP (99,0% en peso), hidroxiapatita (1,0% en peso)

- 20 blanco con puntos grises: α -TCP (98,0% en peso), hidroxiapatita (2,0% en peso)

La figura 7 muestra la dureza [%] del IFS dependiendo del tamaño de partícula de α -TCP en función del tiempo (1, 48 y 144 h).

Cada formulación comprende PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso) y un cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

- 25 El cemento de fosfato de calcio consiste en α -TCP (62,5% en peso), CaHPO_4 (26,8% en peso), CaCO_3 (8,9% en peso), hidroxiapatita (1,8% en peso).

El tamaño de partícula de α -TCP se varía:

negro: tamaño de partícula de gránulos de α -TCP $\rightarrow$ 300 - 500 μm

gris: tamaño de partícula de gránulos de α -TCP $\rightarrow$ 500 - 700 μm

- 30 blanco: tamaño de partícula de gránulos de α -TCP $\rightarrow$ 700 - 1000 μm

blanco con puntos grises: tamaño de partícula de gránulos de α -TCP $\rightarrow$ < 300 μm

En la figura 7 los inventores muestran la influencia del tamaño de partícula del material de relleno inorgánico analizado sobre las propiedades mecánicas de la pasta de endurecimiento *in situ* con estabilidad mecánica mejorada cuando se usa un material de relleno con un tamaño de partícula de 300 μm o mayor.

- 35 La figura 8 muestra el impacto de diferentes disolventes orgánicos sobre la dureza de las composiciones de IFS a lo largo del tiempo.

negro: PLGA RG 503H (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso). La composición del cemento de fosfato de calcio usado se describe bajo la figura 6.

- 40 gris: PLGA (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), N-metilpirrolidona (NMP) (44,5% en peso)

blanco: cemento de fosfato de calcio (42,8% en peso), N-metilpirrolidona (57,2% en peso)

- 45 Los plastificantes preferidos de la presente invención son sustancias no tóxicas tales como PEG o DMSO (véase la figura 11). Tal como se muestra en la figura 8 para PLGA (50/50), los PEG tales como el PEG 400 producen un aumento en la estabilidad mecánica a lo largo del tiempo (de 1 a 98 h) en comparación con la NMP, que se usa frecuentemente en líquidos de polímeros farmacéuticos de la técnica anterior, aunque se clasifica en la "deutschen

Gefahrstoffverordnung" como "Xi" y como "Giftklasse (CH)5".

La figura 9 muestra el efecto plastificante de diferentes disolventes orgánicos en mezclas de IFS con PLGA RG 503H (determinación midiendo la disminución de la temperatura de transición vítrea (Tg) mediante DSC según el ejemplo 21). Dependiendo del disolvente orgánico usado, se altera la Tg del polímero, mientras que una reducción en Tg influye negativamente en las propiedades mecánicas del IFS.

negro: PLGA RG 503H/ polietilenglicol 400 (1:2)

gris: PLGA RG 503H/ N-metilpirrolidona (1:2)

blanco: PLGA RG 503H/ dimetilsulfóxido (1:2)

gris con puntos blancos: PLGA RG 503H

La figura 10 muestra la dureza [%] dependiendo de diferentes tipos de PLGA. Los resultados revelan que han de tenerse en cuenta varias características para la selección de un polímero, que sea adecuado como componente del IFS. Tanto la razón de ácido láctico/ y glicólico con la cadena de polímero como la viscosidad inherente influyen en las propiedades mecánicas del IFS endurecido. La composición del cemento de fosfato de calcio usado se describe bajo la figura 6.

negro: PLGA RG 756 (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso),

gris: PLGA RG 503 (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso),

blanco: PLGA RG 502 (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso),

gris con puntos blancos: PLGA RG 503H (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3%), polietilenglicol 400 (44,5% en peso),

Según la aplicación de la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención, las propiedades mecánicas de la pasta pueden ajustarse mediante la selección del tipo de polímero (figura 10). Gracias a la presente invención, los inventores encontraron que la estabilidad mecánica a largo plazo del implante en medios acuosos puede potenciarse significativamente si se usan polímeros con una razón de ácido láctico/ácido glicólico inferior a 75:25, preferiblemente 50:50 (RG 503H) en comparación con 75:25 (RG 756H). Puede lograrse una mejora adicional de la estabilidad mecánica si se usan polímeros de extremos bloqueados tal como se muestra para RG 503 en comparación con RG 503H' (de extremos no bloqueados) mostrado en las figuras 10 y 12. Además, las propiedades mecánicas se mejoran usando polímeros con un peso molecular aumentado (RG 503 en comparación con RG 502).

La figura 11 muestra el impacto de copolímeros de dibloque de PLGA-PEG sobre la dureza [%] del IFS

negro: copolímero de dibloque (11,4% en peso), dimetilsulfóxido (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (44,1% en peso)

gris: copolímero de dibloque (7,6% en peso), dimetilsulfóxido (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (47,9% en peso)

blanco: copolímero de dibloque (3,8% en peso), dimetilsulfóxido. (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (51,7% en peso)

No sólo puede usarse PLGA como polímero adecuado para fabricar la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención, también los copolímeros de dibloque de PLGA-PEG dan como resultado una pasta con una dureza mayor que el 80% de concentraciones de polímero entre el 3 y el 12% en peso, si se usan con un plastificante en el que el polímero es soluble tal como dimetilsulfóxido.

La figura 12 muestra una degradación sostenida del IFS usando un copolímero de PLGA de extremos bloqueados tal como se determina midiendo la temperatura de transición vítrea (Tg) en función del tiempo mediante DSC tal como se describe en el ejemplo 21. La composición del cemento de fosfato de calcio usado se describe bajo la figura 6.

curva negra: PLGA RG 503 (22,2% en peso, de extremos bloqueados), PEG 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

curva blanca: PLGA RG 503H (22,2% en peso, de extremos no bloqueados), PEG 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

La figura 13 muestra la resistencia mecánica mejorada (dureza [%]) de la composición de IFS a lo largo del tiempo

en comparación con otros dispositivos de autoendurecimiento relacionados. La composición del cemento de fosfato de calcio usado se describe bajo la figura 6.

5 Gracias a la presente invención, pudo desarrollarse una pasta de endurecimiento *in situ* con una mayor resistencia mecánica en el plazo de una hora tras el endurecimiento de la pasta *in situ* en comparación con un cemento de fosfato de calcio (barra blanca) o un sistema a base de polímero que consiste en PLGA y N-metilpirrolidona (barra gris). Además, tras 96 horas la resistencia mecánica fue mayor que las propiedades mecánicas del cemento de fosfato de calcio.

negro: IFS que consiste en PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso) y un cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

10 gris: disolución de polímero que consiste en PLGA RG 756 (45,0% en peso) y N-metilpirrolidona (55,0% en peso)

blanco: un cemento de fosfato de calcio que consiste en alfa-TCP (62,5% en peso), hidrogenofosfato de calcio (26,8% en peso), carbonato de calcio (8,9% en peso) e hidroxiapatita (1,8% en peso)

15 La figura 14 muestra la capacidad de formación de poros de la sal de sodio de carboximetilcelulosa en diferentes concentraciones sobre la capacidad de formación de poros sobre la superficie externa del IFS. Gracias a la presente invención, pudo impedirse la formación de piel alrededor de la pasta de endurecimiento *in situ* mediante la adición de agentes de formación de poros tales como la sal de sodio de carboximetilcelulosa, que muestra las propiedades de hinchamiento en un ambiente acuoso. Si se introduce la sal de sodio de carboximetilcelulosa en la formulación de IFS, se produce un proceso de formación de poros sobre la superficie de la composición de IFS tras la aplicación (endurecimiento *in situ*) con tamaños de poro, que facilitan ahora la migración celular al interior de las estructuras internas del IFS. Sin embargo, sólo puede lograrse una macroporosidad suficiente tras la adición de, por ejemplo, la sal de sodio de carboximetilcelulosa a la composición de la presente invención, mientras que otras composiciones tales como las que comprenden NMP son menos porosas en la estructura externa de la matriz de formación *in situ*.

A) PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso)

25 B) PLGA RG 503H (21,6% en peso), polietilenglicol 400 (43,4% en peso), cemento de fosfato de calcio (32,5% en peso), sal de sodio de carboximetilcelulosa (2,5% en peso)

C) PLGA RG 503H (21,1% en peso), polietilenglicol 400 (42,3% en peso), cemento de fosfato de calcio (31,6% en peso), sal de sodio de carboximetilcelulosa (5,0% en peso)

D) PLGA RG 756 (45,0% en peso), N-metilpirrolidona (55,0% en peso)

30 E) PLGA RG 756 (43,9% en peso), N-metilpirrolidona (53,6% en peso), sal de sodio de carboximetilcelulosa (2,5%)

F) PLGA RG 756 (42,8% en peso), N-metilpirrolidona (52,2% en peso), sal de sodio de carboximetilcelulosa (5,0% en peso)

La figura 15 presenta una microfotografía SEM del IFS que muestra los muchos macroporos de la pasta endurecida y poros de interconexión.

35 A muestra una microfotografía SEM del IFS que se tomó según el ejemplo 20.

La muestra mostrada es el resultado de dos secciones transversales formando un ángulo de 90°. Las dos direcciones principales en las que ha tenido lugar la formación de poros en todo el andamiaje conducen a una red tridimensional de poros de interconexión (micro y macroporos).

40 composición del IFS: PLGA RG 503H (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso)

B muestra poros de interconexión del IFS

La fotografía realizada mediante microscopía óptica muestra el área de sección transversal de una muestra de IFS de la siguiente composición: PLGA 503H (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso).

45 Gracias a la presente invención, pudo generarse un andamiaje macroporoso similar a la sustancia esponjosa. Las flechas explican regiones, que muestran la interconectividad de poros generados dentro de la pasta de endurecimiento *in situ* de la invención, que están presentes por todo el andamiaje *in situ* formado.

50 La figura 16 muestra la liberación de rhGDF-5 desde la composición de IFS a lo largo del tiempo en días. El IFS usado se componía de PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso); cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso) que incluía gránulos recubiertos con rhGDF-5 de α -TCP (62,5% en peso); resultando una

concentración de rhGDF-5: 104 µg/g de IFS. Se determinó la liberación de proteína tal como se describe por el ejemplo 15 a 4°C. Gracias a la presente invención, pudo mostrarse una liberación sostenida de agente activo a lo largo de 7 días. Tras 7 días, sólo se administró el 60% de agente activo.

La figura 17 muestra la estabilidad de gránulos recubiertos con rhGDF-5 de α -TCP en diversos disolventes orgánicos (A - acetona, B - NMP, C - PEG 400) determinada según el ejemplo 14 en condiciones no estériles. D muestra gránulos recubiertos con rhGDF-5 de α -TCP sin tratamiento con disolventes orgánicos como control. Se determinó la estabilidad de la proteína como el área de pico relativa mediante la cantidad de rhGDF-5 nativo tras la extracción de los gránulos recubiertos de α -TCP. La mayor estabilidad pudo lograrse para PEG 400 con respecto a los demás disolventes orgánicos analizados usando rhGDF-5 como agente activo a modo de ejemplo. La estabilidad puede aumentarse adicionalmente si las condiciones de fabricación se mejoran adicionalmente tal como la fabricación en condiciones estériles, gas inerte o la adición de estabilizadores.

La figura 18 muestra la resistencia al lavado de IFS en comparación con otros sistemas del estado de la técnica tales como la pasta de hidroxiapatita Ostim® adquirida de Heraeus Kulzer (A) y el cemento de fosfato de calcio Calcibone® adquirido de Merck (C) con el IFS de la presente invención (B) tras la aplicación de la pasta a agua pura. La pasta de endurecimiento *in situ* usada se componía de PLGA RG 503H (22,2% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso) y un cemento de fosfato de calcio hasta el 100% que contenía α -TCP (62,5% en peso), hidrogenofosfato de calcio (26,8% en peso), carbonato de calcio (8,9% en peso) e hidroxiapatita (1,8% en peso). Se llevó a cabo el ensayo a la temperatura ambiental. Se inyectó directamente Ostim® en los medios acuosos. Se premezcló el Calcibone® mediante inmersión de 1 g de polvo de cemento y 0,32 ml de líquido de cemento. Tras 5 minutos, se puso la mezcla de cemento pastosa resultante en los medios acuosos. Pudo observarse, que el IFS mostraba excelente resistencia al lavado, permanecía estable y se endurecía cuando se sumergía en agua a diferencia de la otra muestra analizada.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A La pasta de endurecimiento *in situ*

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona generalmente una composición de pasta de endurecimiento *in situ* que incluye al menos tres componentes: un plastificante, que es un líquido orgánico biocompatible soluble en agua o miscible en agua, un polímero insoluble en agua, que es biocompatible, biodegradable y/o biorresorbible y soluble en el plastificante, y un material de relleno sólido insoluble en agua, que es insoluble en el plastificante, en la que la pasta es inyectable y estable en su envase y se endurece tras colocarse en el defecto. Tras ponerse en contacto con un medio acuoso o fluido corporal, la pasta de endurecimiento *in situ* puede producir endurecimiento *in situ* para formar un implante sólido. Preferiblemente, la estabilidad en el envase de la pasta premezclada es al menos durante varias semanas, más preferiblemente varios meses, lo más preferiblemente al menos un año. La estabilidad puede entenderse como una consistencia y moldeabilidad de la pasta de endurecimiento *in situ* premezclada sin alteraciones drásticas en la consistencia a lo largo del tiempo. El envase es un envase hermético usado comúnmente tal como el usado comúnmente para aplicaciones parenterales en aplicaciones farmacéuticas.

El término pasta de endurecimiento *in situ*, andamiaje de formación *in situ* (IFS), pasta de formación *in situ*, IFS, composición de IFS, pasta de material compuesto de cerámica/polímero y pasta se usan de manera intercambiable dentro de la presente invención.

El término "endurecimiento *in situ*" tal como se usa en la presente invención se refiere a un implante sólido que se forma tras el contacto con un medio acuoso tal como agua, una solución fisiológica o fluido corporal tras la disipación o disolución del disolvente orgánico en los alrededores *ex vivo* así como en un organismo tal como un tejido o cuerpo humano o de animal. Dependiendo de la indicación y el uso de la pasta, un implante sólido de este tipo también englobaría un implante que al menos tiene una mayor resistencia mecánica tras ponerse en contacto con un fluido corporal circundante que la pasta antes de la aplicación, por ejemplo, en el caso de una pasta de endurecimiento *in situ* para reparación periodontal.

El término "pasta" tal como se usa según la presente invención se refiere a una mezcla o material blando, suave, espeso, o pasta como entidad administrable usando una jeringa o aplicación mínimamente invasiva, que comprende al menos tres componentes, preferiblemente al menos cuatro componentes, lo más preferiblemente al menos cinco componentes tal como se expuso anteriormente. La pasta es adecuada para el relleno de defectos quirúrgicos, la regeneración tisular o el aumento óseo. En otra realización, la pasta se usa como sistema de administración de fármacos para la liberación controlada de sustancias activas tras la implantación.

En una realización preferida, la pasta de la presente invención está libre de sustancias tóxicas. Preferiblemente, tales sustancias tóxicas ya se evitan en el proceso de producción, ya que su producción requiere gastos adicionales debido a las etapas de eliminación requeridas durante el proceso de producción y medios caros necesarios para el análisis químico de alta sensibilidad.

El término "sustancias tóxicas", en particular, engloba aquellos disolventes y aditivos orgánicos tóxicos que se usan

mediante los métodos descritos en la técnica, que se clasifican por la ICH como disolventes de clase 2 (ICH Topic Q 3 C Impurities: Residual Solvents ("Impurezas: disolventes residuales") por ejemplo cloruro de metileno. Dichas sustancias pueden provocar efectos tóxicos sistémicos o locales, inflamación y/u otras reacciones tras la implantación de dispositivos que contienen dichas sustancias. Dichos dispositivos de la técnica anterior son menos aceptables terapéuticamente debido a dichos efectos secundarios no deseados, que no pueden evitarse mediante los métodos de recubrimiento convencionales descritos en la técnica. Además, la orientación internacional para el desarrollo de proteínas terapéuticas requiere que en el proceso de fabricación deban evitarse sustancias perjudiciales y tóxicas (para más detalles véase: Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH: *International Conference on Harmonization*), Topic Q3C; www.emea.eu.int/). Sin embargo, la pasta de la presente invención o una pasta que puede obtenerse mediante el método de la presente invención está, ventajosamente, libre de dichas sustancias tóxicas clasificadas como de clase 1. Además la presente invención contiene sólo disolventes clasificados como de clase 3 mediante la ICH Topic Q 3C y, por tanto, muy aceptables terapéuticamente y satisface los requisitos de las autoridades normativas. Preferiblemente, los mismos requisitos que para los disolventes en común son válidos para el plastificante, el material de relleno sólido insoluble en agua y/o el material de relleno generador de poros soluble en agua de la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención.

El término "densidad" significa la densidad de la formulación pastosa antes de la aplicación a un organismo y antes del endurecimiento. Se calcula según el ejemplo 23. La densidad de la composición de pasta de la presente invención es igual a o mayor que 1,21 mg/ml.

Además, en una realización preferida adicional de la pasta o el método de la invención dicha pasta está libre de material infeccioso.

Además de sustancias tóxicas, el material infeccioso comprendido en un dispositivo de la técnica anterior puede provocar graves infecciones en un sujeto al que se le ha trasplantado el dispositivo. Sin embargo, se usa gelatina potencialmente infecciosa derivada de huesos de bovinos o cerdos como proteína protectora en muchos métodos del estado de la técnica (Lind *et al.*, 1996).

La variación de la concentración de los componentes de la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención conduce a una adaptación a una aplicación médica específica mediante cambios dentro de la consistencia de la pasta inyectable, el tiempo de endurecimiento *in situ*, la porosidad y las propiedades mecánicas del implante final. Adicionalmente, la variación de estos parámetros es un medio potente en la adaptación de la cinética de liberación del agente activo mediante el cambio del comportamiento de degradación del polímero insoluble en agua.

B El plastificante

El término "plastificante" según la presente invención significa un líquido orgánico soluble en agua o miscible en agua o disolvente que es farmacéuticamente aceptable o una mezcla de los mismos. Dependiendo de la característica del agente activo, la función del plastificante es disolver el polímero biodegradable, biocompatible y/o biorresorbible insoluble en agua o disolver el polímero biodegradable, biocompatible y/o biorresorbible insoluble en agua y disolver o suspender el agente activo; suspender el material de relleno sólido insoluble en agua; o disolver el polímero insoluble suspendiendo adicionalmente el material de relleno sólido insoluble en agua. Durante el endurecimiento *in situ* en contacto con medio acuoso o fluido corporal, el plastificante difunde fuera de la pasta, dejando poros y conduciendo a un implante *in situ* o dispositivo de material compuesto estable en cuanto a la forma. Por tanto, el plastificante ha de ser un disolvente soluble en agua o miscible en agua, y es un líquido, preferiblemente un polímero soluble en agua. Preferiblemente, el plastificante tiene un bajo impacto sobre la temperatura de transición vítrea del polímero insoluble en agua en el implante endurecido *in situ* y es compatible con el agente activo. Dependiendo del polímero insoluble en agua, debe usarse un plastificante seleccionado de un grupo de plastificantes definido adicionalmente a continuación con el menor impacto sobre la temperatura de transición vítrea del polímero tras el fraguado.

El término "disolver" significa la disolución o suspensión de una sustancia en un líquido, produce una distribución homogénea de la sustancia dentro del líquido.

Dicho plastificante es biocompatible. Dicho plastificante se selecciona de polietilenglicol (PEG) 400, PEG 200, PEG 300, PEG 600, 1,3-butanodiol, aceite de ricino, alcoholes C2 a C6, propilenglicol, solcetal, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, lactato de etilo, metil etil cetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilsulfona, tetrahidrofurano, caprolactama, decilmethylsulfóxido, ácido oleico, carbonato de propileno, triacetina, N,N-diethyl-m-toluamida, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona o mezclas de los mismos.

Preferiblemente, dicho plastificante es un polietilenglicol, por su impacto relativamente bajo sobre la Tg del componente polimérico (figuras 8, 9), comprendiendo el procedimiento de endurecimiento acelerado del polietilenglicol pastas en comparación con aquéllos que comprenden N-metilpirrolidona (figura 13), y la alta compatibilidad de polietilenglicol con proteínas (figura 17).

Preferiblemente, la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención contiene menos del 60% del plastificante, más preferiblemente menos del 55%, más preferiblemente menos del 50%, aún más preferiblemente igual a o menos del 45%, pero más del 40%, lo más preferiblemente entre el 40% y el 45%. Los andamiajes de

formación *in situ* de la presente invención que contienen tal cantidad de PEG presentan propiedades mecánicas mejoradas (figura 4).

El término "biocompatible" significa la capacidad de un material para actuar con una respuesta del huésped apropiada en una aplicación específica (Wintermantel E. *et al.*; 2002). Además el término "biocompatible" significa, que el material no presenta ninguna propiedad tóxica y que no induce ninguna reacción inmunológica ni inflamatoria tras la aplicación.

El término "biodegradable" especifica materiales, por ejemplo polímeros, que se descomponen debido a una degradación macromolecular con dispersión *in vivo* pero para los que no existen pruebas de la eliminación del organismo. La disminución en masa del material biodegradable dentro del organismo es el resultado de un proceso pasivo, que está catalizado por las condiciones fisicoquímicas (por ejemplo, humedad, valor de pH) dentro del tejido del huésped.

El término "biorresorbible" especifica materiales tales como materiales poliméricos, que experimentaron degradación y resorción adicional *in vivo*; es decir polímeros, que se eliminan a través de rutas naturales o bien debido a la simple filtración de subproductos de degradación o tras su metabolización. La biorresorción es, por tanto, un concepto, que refleja la eliminación total del material extraño inicial. En una realización preferida de la pasta o el método de la invención, dicho polímero biorresorbible es un polímero que experimenta una escisión de cadena debido a una degradación macromolecular en un entorno acuoso. Ha de mencionarse que el término "resorción" siempre describe un proceso activo.

C El polímero insoluble en agua

El término "polímero insoluble en agua" significa un polímero no soluble en agua, es decir no forma una fase homogénea cuando se mezcla con agua, que es soluble en el plastificante y que puede solidificar en medios acuosos para formar un implante sólido en el que el material de relleno sólido insoluble en agua se incorpora tras la retirada del plastificante en el tejido circundante. Preferiblemente, dicho polímero insoluble en agua es un polímero "biocompatible", uno "biodegradable" y/o uno "biorresorbible". Más preferiblemente, dicho polímero insoluble en agua es un polímero alifático preferiblemente con una temperatura de transición vítrea superior a 35°C de la sustancia polimérica pura. La viscosidad inherente (viscosidad medida a 25°C, al 0,1% en cloroformo) de los polímeros de la invención oscilará entre aproximadamente 0,1 dl/g y 5 dl/g, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 dl/g y 1 dl/g.

Alternativamente, dicho polímero insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polietileno (PE), polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), poliglactina, poliamida (PA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(metacrilato de hidroximetilo) (PHEMA), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poli(alcohol vinílico) (PVA), politetrafluoretileno (PTFE), polieterecetona (PEEK), polisulfona (PSU), poliuretano, polisiloxano o mezclas de los mismos. Estos polímeros son al menos biocompatibles.

Más preferiblemente, dicho polímero se selecciona del grupo que consiste en poli(alfa-hidroxiácidos), poli(ortoésteres), poli(anhídridos), poli(aminoácidos), poliglicolida (PGA), polilactida (PLLA), poli(D,L-lactida) (PDLLA), poli(D,L-lactida-co-glicolida) o poli(L-lactida-co-glicolida) (PLGA), copolímeros de poli(ácido láctico-co-glicólico)-polietilenglicol (PLGA-PEG), poli(ácido 3-hidroxibutírico) (P(3-HB)), poli(ácido 3-hidroxivalérico) (P(3-HV)), poli(p-dioxanona) (PDS), poli(épsilon-caprolactona) (PCL), polianhídrido (PA), copolímeros, terpolímeros, copolímeros de bloque, combinaciones, mezclas de los mismos. Estos polímeros son al menos biocompatibles y biodegradables.

El término "contenido en polímero de la composición" significa la proporción en peso del polímero contenido en una formulación con relación al peso total de la composición. La pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención tiene preferiblemente un contenido en polímero igual a o menor que el 40% en peso del polímero, más preferiblemente igual a o menor que el 35% en peso de polímero, aún más preferiblemente igual a o menor que el 33% en peso, lo más preferiblemente del 20 al 25% en peso. Estas composiciones con una cantidad seleccionada de polímero presentan las mejores propiedades mecánicas de la pasta de endurecimiento *in situ* según la invención (figuras 2 a 4).

Más preferiblemente, dicho polímero es PLGA, lo más preferiblemente PLGA (50:50). Mediante el cambio de la razón de ácido láctico:ácido glicólico, es posible adaptar a medida la tasa de degradación a la requerida para la aplicación o uso específico variando la composición de ácido glicólico dentro de la cadena de polímero entre el 0 y el 100% molar (%m) de ácido glicólico, preferiblemente el 50 %m (50:50) dentro de la cadena de polímero. Otro posible parámetro para ajustar con precisión el comportamiento de degradación del polímero es la selección de la razón enantiomérica del ácido láctico (forma d o forma l). PLGA (50:50) significa una razón monomérica de ácido láctico:ácido glicólico en la cadena de polímero de aproximadamente 1:1.

Según la presente invención, PLGA con un mayor peso molecular da como resultado implantes con una mayor estabilidad mecánica a lo largo del tiempo tal como se observó para el polímero de mayor peso molecular RG 503 en comparación con el polímero de menor peso molecular RG 502 tal como se muestra en la figura 10. Por tanto, preferiblemente son favorables los polímeros con un mayor peso molecular.

En otra realización de la presente invención, el polímero insoluble en agua es un polímero de extremos bloqueados. El término "polímero de extremos bloqueados" significa que el grupo ácido carboxílico libre de la cadena de polímero lineal tal como está presente, por ejemplo, en el polímero RG 503H se ha esterificado con alcoholes. Usando polímeros de extremos bloqueados y la regulación de la cantidad de grupos ácido carboxílico libres dentro del polímero, puede regularse la tasa de degradación del polímero dependiendo de la aplicación de la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención. Los inventores encontraron además en extensos estudios de degradación que la estabilidad mecánica a largo plazo del implante en medios acuosos puede potenciarse significativamente si se usan polímeros de extremos bloqueados tal como se muestra para un PLGA (50:50) tal como RG 503 (figura 10). La degradación puede demostrarse, por ejemplo, mediante la investigación de la disminución de la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero (figura 12). Experimentos analíticos adicionales muestran una relación entre la temperatura de transición vítrea del polímero y la estabilidad mecánica *in vitro* tal como se determina en los ejemplos. Una baja temperatura de transición vítrea da como resultado una disminución de la estabilidad mecánica del andamiaje de formación *in situ*. Además estos productos de degradación (por ejemplo, oligómeros) pueden ejercer un efecto plastificante sobre la entidad polimérica residual que reduce la resistencia mecánica.

En otra realización de la presente invención, el polímero insoluble en agua es un copolímero de PLGA-PEG, preferiblemente un copolímero de dibloque o tribloque de PLGA-PEG. Tal como se muestra en la figura 11, también pueden generarse pastas de endurecimiento *in situ* adecuadas en las que los componentes poliméricos son copolímeros de dibloque de PLGA-PEG. Mediante la alteración de la razón PLGA/PEG dentro de la cadena de polímero, estos polímeros permiten un ajuste adicional del comportamiento de degradación. En lugar de los polímeros de PGA convencionales sin PEG, estos materiales permiten la liberación de agentes activos incorporados, mediante difusión. Tal como se mostró según la invención, las formulaciones de copolímeros de dibloque de PLGA-PEG presentan propiedades mecánicas comparables a formulaciones que contienen PLGA como componente polimérico. En efecto, el copolímero de dibloque de PLGA-PEG usado apenas era soluble en polietilenglicol. En tales casos, es necesario seleccionar otro plastificante tal como dimetilsulfóxido (DMSO).

D El material de relleno sólido insoluble en agua

El término "material de relleno sólido insoluble en agua" significa un compuesto insoluble en agua así como en el plastificante, es decir, no forma una fase homogénea cuando se mezcla con agua o el plastificante. El material de relleno sólido insoluble en agua sirve como matriz en la pasta, y como portador para el agente activo dentro del andamiaje formado *in vivo*, una vez que se endurece la pasta. Además, el material de relleno sólido insoluble en agua puede aumentar adicionalmente la biocompatibilidad (por ejemplo, unión celular) para estabilizar el pH local durante la degradación del polímero.

Preferiblemente, dicho material de relleno sólido insoluble en agua es un compuesto inorgánico u orgánico.

Preferiblemente, el compuesto inorgánico se selecciona del grupo de óxido de magnesio, hidróxido de magnesio, carbonato de magnesio, dióxido de silicio o un compuesto de calcio. Dicho material de relleno insoluble en agua forma una matriz inorgánica dentro del polímero insoluble en agua. Dicha matriz inorgánica consiste en cerámicas y mejora, en el estado endurecido, las propiedades osteoconductoras así como la actuación mecánica del andamiaje. Usando un material de relleno sólido insoluble en agua, es posible reducir la cantidad del polímero insoluble en agua sin disminuir el comportamiento global del andamiaje. Más preferiblemente, dicho material de relleno insoluble en agua es un fosfato de calcio; sulfato de calcio o carbonato de calcio, lo más preferiblemente fosfato de tricalcio, beta-fosfato de tricalcio (β -TCP), alfa-fosfato de tricalcio (α -TCP), apatita, cemento que contiene fosfato de calcio o fosfato de tetracalcio, o una mezcla de los diversos compuestos inorgánicos diferentes anteriores, preferiblemente que contienen calcio.

El término "fosfato de calcio" engloba composiciones que comprenden iones calcio (Ca^{2+}), iones fosfato (PO_4^{3-}), opcionalmente iones adicionales como iones hidroxilo (OH^-), carbonato (CO_3^{2-}) o magnesio (Mg^{2+}) u otros iones que son adecuados para el material de relleno sólido insoluble en agua de la presente invención. Los fosfatos de calcio tal como se usan según la presente invención son cristales que tienen una estructura tridimensional adecuada para la pasta de la presente invención, tal como se expuso anteriormente. Dicho fosfatos de calcio son particularmente bien adecuados como portadores para la pasta de la presente invención. Sus propiedades *in vivo* se han descrito en Hotz, 1994, Gao, 1996, y en el documento WO98/21972. Anteriormente se facilitó una lista de fosfatos de calcio preferidos y bien conocidos.

Los cementos que contienen fosfato de calcio (CPC) incluyen, pero no se restringen a, por ejemplo CPC de apatita, CPC de brushita, mezclas de fosfato de tetracalcio (TTCP) y fosfato de dicalcio anhidro (DCPA), mezclas de alfa-TCP e hidroxiapatita o cemento Calcibon® (Biomet Merck Darmstadt), que consiste en una mezcla del 62,5% en peso de alfa-fosfato de tricalcio, el 26,8% en peso de fosfato de dicalcio anhidro (DCPA), el 8,9% en peso de carbonato de calcio (CaCO_3) y el 1,8% en peso de hidroxiapatita (HA). Se describen ejemplos adicionales de CPC anteriormente y a continuación. Los cementos que contienen fosfato de calcio pueden combinarse con uno o más materiales de relleno insolubles en agua inorgánicos.

Preferiblemente, el compuesto orgánico se selecciona de quitosano, colágeno, alginato de calcio, poli(metacrilato de

2-hidroxietilo), ácido hialurónico o derivados del mismo, celulosa o derivados de la misma, o almidón o derivados y/o cualquier combinación de los mismos.

Pueden añadirse materiales de relleno orgánicos para aumentar la bioadhesión del implante, por ejemplo, colágeno. Tales componentes pueden afectar adicionalmente a las propiedades mecánicas finales (por ejemplo, resistencia a la tracción, torsión) del implante de manera comparable a la función del colágeno dentro del hueso natural tal como refuerzo de fibras.

La pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención es eficaz para su uso en organismos tales como seres humanos y animales, en la que la composición proporciona un andamiaje mineral duradero para soportar el crecimiento de hueso. Por consiguiente, una característica de la presente invención es la provisión de una composición premezclada estable útil, por ejemplo, como material de relleno de vacíos o para el aumento óseo.

Según la presente invención, la matriz de material compuesto se basa preferiblemente en un fosfato de calcio, que es un beta-fosfato de tricalcio, alfa-fosfato de tricalcio, apatita, hidroxiapatita, carbonato de calcio, hidrogenofosfato de calcio y/o un cemento que contiene fosfato de calcio o una mezcla de los mismos.

En un material compuesto de este tipo, el fosfato de calcio muestra excelente capacidad de tamponamiento local y la estructura de material compuesto permeable evita incluso la disminución del pH local cuando el polímero se degrada *in vivo*. De ahí que los efectos secundarios citotóxicos debidos a la degradación del polímero se reducen o se evitan. Esto es especialmente válido porque el material cerámico es el componente principal del material compuesto de cerámica/polímero de la presente invención, que contiene preferiblemente menos del 40% en peso del polímero, más preferiblemente menos del 35% en peso de polímero tal como PLGA, aún más preferiblemente igual a o menos del 33% en peso de PLGA, lo más preferiblemente del 20 al 25% en peso.

En una realización preferida de la presente invención, el contenido del material de relleno sólido insoluble en agua en la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención es menos del 50% en peso, entre el 25% en peso y el 50% en peso, preferiblemente entre el 28% en peso y el 38% en peso, lo más preferiblemente entre el 30% en peso y el 36% en peso. Además, el contenido del material de relleno sólido insoluble en agua se elige preferiblemente dependiendo del polímero insoluble en agua, por ejemplo con una razón de material de relleno insoluble en agua con respecto a polímero insoluble en agua de 1,2:1 a 4:1, preferiblemente de 1,2:1 a 2:1, más preferiblemente de 1,2:1 a 1,8:1, lo más preferiblemente de 1,5:1. La presente invención se basa en los resultados sorprendentes adicionales de que en el plazo de un día, la pasta de endurecimiento *in situ* según la invención que contiene un material de relleno sólido insoluble en agua en el intervalo de igual a o más de aproximadamente el 15% en peso y un polímero insoluble en agua de menos del 40% en peso, tiene una mayor resistencia mecánica que otros sistemas tales como CPC, CPC y plastificante o un sistema de polímero/disolvente orgánico convencional (PLGA/PEG) (figura 2). A lo largo de 24 días, la pasta de endurecimiento *in situ* que contiene un material de relleno sólido insoluble en agua en el intervalo de más del 20% y un polímero insoluble en agua de menos del 38% tiene una dureza comparable al CPC o CPC y plastificante y una dureza mejorada significativamente con respecto a PLGA/PEG solo tal como se muestra en las figuras 2 y 3. La influencia de la razón de fosfato de calcio en función del tiempo sobre la dureza de diversas pastas de endurecimiento *in situ* también se ha analizado tal como se muestra por ejemplo en la figura 3. Los ejemplos seleccionados han mostrado composiciones preferidas con una resistencia mecánica ideal que contienen una razón de material de relleno sólido insoluble en agua con respecto a polímero insoluble en agua de aproximadamente 1,5:1 (barra gris en la figura 3).

Además sorprendentemente los inventores encontraron que los cementos de fosfato de calcio tales como un cemento de fosfato de calcio que consiste en α -TCP (62,5% en peso), CaHPO_4 (26,8% en peso), CaCO_3 (8,9% en peso), hidroxiapatita (1,8% en peso), α -TCP con diversas concentraciones de hidroxiapatita o α -TCP pueden mejorar adicionalmente las propiedades mecánicas de la pasta de endurecimiento *in situ*, en comparación con formulaciones que contienen sólo β -TCP como material de relleno inorgánico (figuras 5, 6). Esto también incluye que la cantidad de hidroxiapatita como cristal simiente puede variarse al menos entre el 0% y el 2%, dando como resultado un IFS con fuertes propiedades mecánicas.

En una realización adicional, el tamaño de partícula del alfa-fosfato de tricalcio de la pasta de endurecimiento *in situ* es igual a o mayor que 300 μm , más preferiblemente igual a o mayor que 500 μm , lo más preferiblemente de entre 500 μm y 1000 μm .

De manera inesperada, los inventores encontraron que el tamaño de partícula del fosfato de tricalcio tiene un impacto adicional sobre la actuación mecánica de la pasta de endurecimiento *in situ* (figura 7), en el que un aumento del tamaño de partícula de α -TCP mejora adicionalmente las propiedades mecánicas de la pasta de endurecimiento *in situ*. Un aumento en el tamaño de partícula hasta 300 μm o más aumenta adicionalmente las propiedades mecánicas.

E El material de relleno generador de poros soluble en agua

El término "material de relleno generador de poros soluble en agua" significa un compuesto que es farmacéuticamente aceptable y puede hincharse o es soluble en un fluido acuoso tal como agua o fluido corporal

que cuando se añade a la pasta de endurecimiento *in situ* aumenta el número y el tamaño de micro y macroporos dentro del implante sólido de endurecimiento *in situ*, *ex vivo* y en el organismo. La porosidad del implante sólido formado aumentará dependiendo de la cantidad de material de relleno generador de poros soluble en agua usado. El material de relleno generador de poros soluble en agua usado aumenta el número de poros, preferiblemente macroporos, de un tamaño suficiente para el crecimiento de células vivas dentro del interior del implante sólido de endurecimiento *in situ*, preferiblemente la capa externa del implante.

En una realización preferida, el material de relleno generador de poros soluble en agua es un agente contra la formación de piel tal como un agente que reduce o elimina una formación de piel alrededor de la pasta de endurecimiento cuando la pasta de endurecimiento *in situ* está colocándose en un defecto y se pone en contacto con un fluido acuoso o fluido corporal. La expresión "material de relleno generador de poros soluble en agua" pretende incluir la formación de macroporos no sólo en el interior del andamiaje formado *in situ* sino también dentro de la superficie externa o la piel para permitir el crecimiento de células y la sustitución del material por nueva formación de hueso.

El material de relleno generador de poros soluble en agua incluye compuestos farmacéuticamente aceptables que se disipan del implante *in situ* y dan como resultado de ese modo la formación de poros dentro del implante.

En una realización, los materiales de relleno generadores de poros solubles en agua son agentes de hinchamiento. En contacto con medios acuosos, estos excipientes aumentan su volumen y se disuelven en el fluido circundante dejando tras de sí una estructura interconectada porosa. Usando diferentes cantidades de material de relleno generador de poros soluble en agua, puede adoptarse la porosidad de la pasta de endurecimiento *in situ* y regularse la cantidad y el tamaño de poros. Una ventaja de usar agentes de hinchamiento como los materiales de relleno generadores de poros solubles en agua en comparación con los materiales de relleno generadores de poros tales como sales (por ejemplo, cloruro de sodio) es que una cantidad reducida de estos materiales es eficaz puesto que el volumen aumentará debido a la captación de agua. Otros agentes de hinchamiento según la presente invención son agentes de expansión conocidos por los expertos en el campo de la fabricación de comprimidos.

Los agentes de hinchamiento de la presente invención incluyen tales como alginato de sodio, amilasa, amilopectina, almidón, ácido hialurónico, hialuronato de sodio, gelatina, colágeno, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, sal de calcio de carboximetilcelulosa, sal de calcio de carboximetilcelulosa, hidroxilpropil-metilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietilcelulosa o metilhidroxietilcelulosa.

En otra realización, los materiales de relleno generadores de poros solubles en agua son tensioactivos, preferiblemente copolímeros de bloque de óxido de etileno/sorbitano y óxido de propileno tales como Pluronic® o Tween® 80 (por ejemplo, Polysorbate 80; Montanox® 80; monooleato de polioxietileno-sorbitano). Estos materiales de relleno generadores de poros introducen una porosidad mediante disolución en medios acuosos de manera análoga al cloruro de sodio (efecto de lixiviación de sal) pero también pueden estabilizar la estructura porosa en formación. Este efecto se refiere a su naturaleza anfipática (anfífila) y actividad superficial y estos materiales, por tanto, se usan ampliamente como agentes de estabilización de espuma.

En otra realización, los materiales de relleno generadores de poros solubles en agua adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen sustancias porogénicas tales como azúcares o sales de tamaño cristalino, que proporcionarán poros cuando se disuelven en el implante *in situ*.

Otros agentes de formación de poros forman burbujas de gas CO₂ y dejan de ese modo poros cuando se mueven del implante.

El experto sabe qué parámetros pueden ajustarse para producir tamaños de poro de más de 100 µm, preferiblemente de 100 a 500 µm, con los materiales de relleno generadores de poros anteriores. Estos tamaños de poro no están sólo presentes en los poros de interconexión, sino también sobre la superficie de la pasta de endurecimiento *in situ* para permitir crecimientos de células de los alrededores celulares en el sitio del implante (figura 15).

Preferiblemente, el porcentaje en peso del material de relleno generador de poros soluble en agua es de menos del 10% en peso, más preferiblemente de menos del 5% en peso, aún más preferiblemente de menos del 2,5% en peso, lo más preferiblemente de menos del 1% en peso.

Más preferiblemente el material de relleno generador de poros soluble en agua es una sal de carboximetilcelulosa, lo más preferiblemente una sal de sodio de carboximetilcelulosa, de manera óptima con un tamaño de partícula de menos de 1000 µm, más preferiblemente con un tamaño de partícula de 25 a 1000 µm. Preferiblemente, el porcentaje en peso de la sal de sodio de carboximetilcelulosa es de menos del 10% en peso, más preferiblemente de menos del 5% en peso, aún más preferiblemente de menos del 2,5% en peso, lo más preferiblemente igual o de menos del 1% en peso.

El término "tamaño de partícula" según la presente invención significa una distribución promedio del diámetro del tamaño del material tal como fosfato de tricalcio y carboximetilcelulosa en micrómetros (µm), que puede

determinarse mediante difracción láser. Un intervalo de tamaño de partícula específico de material puede lograrse, por ejemplo, mediante tamizado.

Además fue inesperado que la carboximetilcelulosa superase los obstáculos de una formación de piel externa no macroporosa, preferiblemente la carboximetilcelulosa con un diámetro de tamaño de partícula de entre 25 y 1000 μm aumentó significativamente el número de macroporos mayores que 200 μm dentro de la superficie externa de la pasta endurecida *in situ* tras el contacto con un medio acuoso tal como se muestra en la tabla 3. Una observación inesperada adicional en cuanto a la porosidad en la piel se refiere al disolvente orgánico usado en combinación con el material de relleno generador de poros soluble en agua. Los datos presentados en la figura 14 demuestran una porosidad ventajosa en la piel cuando se usa PEG tal como PEG 400 como plastificante en comparación con NMP.

Usando diferentes concentraciones del material de relleno generador de poros, puede ajustarse el número de macroporos según la aplicación de la pasta de endurecimiento *in situ*.

En otra realización, la pasta de endurecimiento *in situ* tiene poros de interconexión con un diámetro igual a o de más de 100 μm .

El término "poros de interconexión" significa una red de poros y canales de poros con micro y macroporos en la totalidad del implante, lo más preferiblemente macroporos y macrocanales que crean una porosidad con un tamaño de poro suficiente para la infiltración celular tal como células óseas o células precursoras. Según la presente invención, pudo desarrollarse una pasta de endurecimiento *in situ* con una red de poros de interconexión de este tipo que soportan el crecimiento de células vivas para la nueva formación de hueso (figura 15).

F El agente activo

El término "agente activo" comprende un polipéptido o un fármaco de molécula pequeña, que se inmoviliza sobre el material de relleno sólido insoluble en agua y/o se disuelve o se suspende en el plastificante. Preferiblemente, dicho polipéptido o fármaco se distribuye de manera homogénea sobre el portador que contiene fosfato de calcio y/o dentro del polímero.

El término "recubierto" de la presente invención significa que la superficie del material de relleno sólido insoluble en agua está completamente recubierta con el agente activo, mediante lo cual están presentes cantidades idénticas esenciales de proteína en todas y cada una de las zonas de la superficie de dicho portador. Un portador recubierto de manera homogénea según esta invención, preferiblemente, presenta una cobertura máxima con la proteína osteoinductiva en su superficie. Ha de entenderse que los polipéptidos osteoinductivos no se agregan y se inactivan parcial o completamente debido a precipitación o microprecipitación.

El término "recubierto de manera homogénea" o "distribuido de manera homogénea" significa que el agente activo se distribuye de manera homogénea dentro de la fase respectiva, coincide con la descripción de los métodos de las realizaciones (32) y (33). Esto puede lograrse mediante la característica del agente activo que o bien se disuelve en el polímero soluble en agua o bien se adsorbe en el material de relleno insoluble en agua, lo que conduce a una suspensión del material de relleno insoluble en agua recubierto en el polímero soluble en agua. La distribución homogénea es un requisito previo para la liberación eficaz y la actividad del agente activo en el tejido circundante en el sitio de implantación. Además, ha de entenderse que el agente activo no se agrega y se inactiva parcial o completamente debido a precipitación o microprecipitación, y más bien va a obtenerse la unión de proteínas biológicamente activas, no agregadas mediante un recubrimiento homogéneo.

El recubrimiento homogéneo del portador con dicho agente activo y la distribución simultánea y/o adicional del portador dentro del polímero insoluble en agua logra una estructura que actúa de dos maneras: como protección del agente activo y como barrera a la difusión para ralentizar la disolución de la proteína o el péptido para lograr una liberación sostenida. Los métodos descritos (véanse (32) y (33)) permiten la distribución homogénea y la inmovilización del agente activo osteoinductivo en y/o sobre el portador y la liberación sostenida del agente activo debido al componente polimérico tal como se muestra en la figura 17.

La eficacia del procedimiento de recubrimiento se soporta, además, mediante el portador debido a fuerzas capilares que resultan de la presencia de numerosos macro y microporos, preferiblemente interconectados, que debido a su tamaño pueden empujar las disoluciones en los poros.

Además, a diferencia de otros métodos descritos en la técnica, por ejemplo, en el documento WO98/21972, el agente activo se aplica, según los métodos de la presente invención, mediante la unión a los portadores desde el estado soluble para lograr un recubrimiento homogéneo.

Los hallazgos subyacentes a la presente invención demuestran que puede evitarse la agregación de las proteínas en un sistema tricomponente mediante el uso de aditivos adecuados tal como se describe en el presente documento. Una condición previa importante es el conocimiento de la solubilidad del agente activo osteoinductivo dependiendo de la naturaleza de la disolvente, es decir disolvente acuoso y/u orgánico, valor de pH, fuerza iónica y superficies presentes. Para el método (33), el agente activo está de manera homogénea sobre el portador. Esta distribución homogénea se realiza tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO03/043673 usando una

disolución acuosa y un tampón. El término "disolución acuosa" especifica cualquier disolución que comprende agua. La ralentización del aumento del pH provocado por el contacto de la disolución de recubrimiento con los fosfatos de calcio en el portador que reaccionan de manera alcalina, en particular, desempeña un papel importante durante el recubrimiento.

5 Puede distribuirse el agente activo de manera homogénea a través de la superficie interna del material portador y permitirse que se una a la superficie antes de que tenga lugar una precipitación de dicha proteína dentro de la disolución de recubrimiento. Para el método B, pudo demostrarse que el aumento de pH que tiene lugar durante el recubrimiento de fosfatos de calcio se desacelera suficientemente mediante el uso de un ácido débil, tal como ácido acético. Además, la adición de compuestos orgánicos tales como etanol o sacarosa demuestra ser ventajosa
10 adicionalmente. Además, una baja fuerza iónica es una condición previa importante para el recubrimiento satisfactorio de la proteína o el péptido sobre el fosfato de calcio. Además, estas pruebas muestran que también el volumen de las disoluciones de recubrimiento (disolución que contiene agente activo y/o polímero), tiene un efecto considerable sobre la calidad de ambos recubrimientos.

15 El término "osteoconductor" se refiere a sustratos que proporcionan un andamiaje poroso favorable para la unión e infiltración celular de acceso vascular, la formación de cartilago y deposición de tejido calcificado. Los materiales osteoconductivos pueden soportar la generación ósea mediante el efecto de andamiaje (Kenley *et al.*, 1993)

20 El término "osteoinductor" se refiere a la capacidad de la transformación de células madre mesenquimatosas en osteoblastos y condrocitos. Un requisito previo para osteoinducción es una señal que se distribuye por la pasta hacia los tejidos circundantes en los que los precursores de osteoblastos mencionados anteriormente se han activado. Osteoinducción tal como se usa en el presente documento engloba la diferenciación de células mesenquimatosas en células precursoras de hueso, los osteoblastos. Además, osteoinducción también comprende la diferenciación de dicho osteoblastos en osteocitos, las células maduras del hueso. Además, también está englobada por osteoinducción la diferenciación de células mesenquimatosas en condrocitos. En particular en los huesos largos, los condroblastos y los condrocitos que residen en el pericondrio del hueso también pueden diferenciarse en osteocitos.
25 Por tanto, la osteoinducción requiere la diferenciación de células no diferenciadas o menos diferenciadas en osteocitos, que pueden formar el hueso. Por tanto, un requisito previo para la osteoinducción es una señal que se distribuye por la pasta hacia los tejidos circundantes en los que los precursores de osteoblastos mencionados anteriormente residen habitualmente. Tal como se ha descrito anteriormente, las proteínas o los péptidos osteoinductivos usados según la presente invención se liberan de manera sostenida desde la pasta, una vez que dicha pasta ha formado *in situ* un andamiaje duro tras la implantación y dichas proteínas o péptidos osteoinductivos se distribuyen posteriormente de manera eficaz en los tejidos circundantes tal como se muestra en la figura 17.

30 El término "osteogénico" describe la síntesis de nuevo hueso por osteoblastos. Según la presente invención, el hueso preexistente en los alrededores en el lado de implantación de la pasta crece en la pasta endurecida usando la estructura de la pasta endurecida, especialmente formada durante el proceso de endurecimiento, como matriz sobre la que pueden adherirse células (por ejemplo, células óseas).
35

Las proteínas y los péptidos englobados en la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención tienen propiedades osteoinductivas *in vivo*. Por ejemplo, se conoce bien en la técnica que la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) engloba miembros que tienen propiedades osteoinductivas. Se enumeran a continuación miembros individuales de dicha superfamilia de TGF- β , que tienen propiedades osteoinductivas bien
40 particulares. En conclusión, las proteínas o los péptidos osteoinductivos de la pasta de la presente invención tras haberse liberado desde el portador sirven como señal osteoinductiva para los precursores de osteocitos del tejido circundante del lado de implantación de la pasta.

El término "polipéptido osteoinductor" se refiere a polipéptidos, tales como los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), que tienen propiedades osteoinductivas.

45 En una realización preferida adicional de la pasta o el método de la invención, dicha proteína osteoinductiva es un miembro de la familia de TGF- β .

Se ha mostrado que la familia de TGF- β de factores de crecimiento y diferenciación está implicada en numerosos procesos biológicos que comprenden la formación de hueso. Todos los miembros de dicha familia son polipéptidos secretados que comprenden una estructura de dominios característica. En el mismo extremo N-terminal, los
50 miembros de la familia de TGF- β comprenden un péptido señal o una secuencia líder de secreción. Esta secuencia está seguida en el extremo C-terminal por el prodominio y por la secuencia del polipéptido maduro. La secuencia del polipéptido maduro comprende siete cisteínas conservadas, seis de las cuales se requieren para la formación de enlaces disulfuro intramoleculares mientras que una se requiere para la dimerización de dos polipéptidos. El miembro de la familia de TGF- β biológicamente activo es un dímero, compuesto preferiblemente por dos polipéptidos maduros.
55 Los miembros de la familia de TGF- β se secretan habitualmente como proteínas que comprenden además de la secuencia madura, el prodominio. Los prodominios se escinden de manera extracelular y no son parte de la molécula de señalización.

En el contexto de la presente invención, el término "miembro de la familia de TGF- β " o las proteínas de dicha familia

a los que se hace referencia a continuación engloban todas las variantes biológicamente activas de dichas proteínas o miembros y todas las variantes así como sus precursores inactivos. Por tanto, las proteínas que comprenden meramente la secuencia madura así como proteínas que comprenden la proteína madura y el prodominio o la proteína madura, el prodominio y la secuencia líder están dentro del alcance de la invención así como fragmentos biológicamente activos de los mismos. Si un fragmento de un miembro de TGF- β tiene la actividad biológica puede determinarse fácilmente mediante ensayos biológicos descritos, por ejemplo en: Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanka H, Omura S, Suda T, (1990): The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 295-299 o Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K (1996): Identification of type serine/ threonine kinase receptors for growth/ differentiation factor-5. *J. Biol. Chem.* 271: 21345-21352).

Preferiblemente, modelos *in vivo* tal como se describen en los ejemplos adjuntos pueden determinar la actividad biológica según la invención. Además, están englobadas por la presente invención variantes de los miembros de TGF- β que tienen secuencias de aminoácidos que son idénticas en al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% a las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de TGF- β .

Se facilita una visión general de los miembros de la superfamilia de TGF- β en: Wozney JM, Rosen V (1998): Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346: 26-37. Las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de TGF- β pueden obtenerse a partir de las bases de datos bien conocidas tales como Swiss-Prot a través de Internet (<http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>) las secuencias de aminoácidos para BMP-2, BMP-7 y GDF-5, miembros de la familia de TGF con un potencial osteoinductivo particularmente alto, también se muestran en SEQ ID No: 1 a 3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para BMP-2, BMP-7 y GDF-5, miembros de la familia de TGF- β con un potencial osteoinductivo particularmente alto, también se muestran en SEQ ID No: 1 a 3, respectivamente.

Más preferiblemente, dicho miembro de la superfamilia de TGF- β es un miembro de la subfamilia de BMP. Los miembros de la subfamilia de proteínas morfogenéticas óseas (BMP) han mostrado que están implicados, entre otros, en la inducción y remodelación de tejido óseo. Las BMP se aislaron originariamente de la matriz ósea. Estas proteínas se caracterizan por su capacidad para inducir la nueva formación de hueso en sitios ectópicos. Diversos estudios *in vivo* demostraron el fomento de la osteogénesis y condrogénesis de células precursoras por las BMP y plantean la posibilidad de que cada molécula de BMP tenga un papel distinto durante el desarrollo esquelético. Se describen más detalles sobre las propiedades moleculares y biológicas de las BMP en:

Wozney JM, Rosen V (1998): Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346: 26-27, Schmitt J, Hwang K, Winn, SR, Hollinger J (1999): Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 17: 269-278 y Lind M (1996): Growth factors: posible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 67: 407-17.

El polipéptido osteoinductivo de la presente invención se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP- 10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15 y BMP-16. Lo más preferiblemente, dicho miembro de la familia de BMP es BMP-2 o BMP-7.

La secuencia de aminoácidos para la forma prepro de BMP-2 se deposita con el número de registro de Swiss-Prot P12643 y se muestra a continuación. Los aminoácidos 1 a 23 corresponden a la secuencia señal, los aminoácidos 24 a 282 corresponden al propéptido y los aminoácidos 283 a 396 corresponden a la proteína madura. La secuencia de aminoácidos para la forma prepro de BMP-7 se deposita con el número de registro de Swiss-Prot P18075 o se muestra en SEQ ID No: 2. Los aminoácidos 1 a 29 corresponden a la secuencia líder, los aminoácidos 30 a 292 corresponden a la forma pro y los aminoácidos 293 a 431 corresponden a la proteína madura. Preferiblemente, BMP-2 o BMP-7 se refiere a la forma prepro, a la forma pro o al péptido de BMP-2 o BMP-7 maduro, respectivamente. Además también están englobados fragmentos de dichas proteínas que tienen esencialmente la misma actividad biológica, preferiblemente propiedades osteoinductivas. A continuación se proporciona más información de secuencia para BMP-2 y BMP-7.

Alternativamente, el polipéptido osteoinductivo de la presente invención se selecciona de otra familia de TGF- β ; familia, es decir la familia de GDF.

También se ha mostrado que el factor de crecimiento y diferenciación (GDF) está implicado, entre otros, en la inducción y remodelación de tejido óseo. El factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5), también conocido como proteína morfogenética derivada de cartílago-1 (CDMP-1) es un miembro de un subgrupo de la familia de BMP, que también incluye otras proteínas relacionadas, preferiblemente, GDF-6 y GDF-7. La forma madura de la proteína es un homodímero de 27 kDa. Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran el papel de GDF-5 durante la formación de diferentes características morfológicas en el esqueleto de mamíferos. Mutaciones de GDF-5 son responsables de anomalías esqueléticas incluyendo la disminución de la longitud de los huesos largos de las extremidades, el desarrollo anómalo de articulaciones en las extremidades y el esternón (Storm & Kingsley (1999), *Development Biology*, 209,11-27). La secuencia de aminoácidos entre ratón y ser humano está altamente conservada.

Preferiblemente, el polipéptido osteoinductivo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en GDF-1, GDF-2, GDF-3, GDF-4, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10 y GDF-11. Lo más preferiblemente, dicho miembro de la subfamilia de GDF es GDF-5. La secuencia de aminoácidos para la forma prepro de GDF-5 se deposita con el número de registro de Swiss-Prot P43026 o se muestra en SEQ ID No: 3. Los aminoácidos 1 a 27 corresponden a la secuencia líder, los aminoácidos 28 a 381 corresponden a la forma pro y los aminoácidos 382 a 501 corresponden a la proteína madura. Preferiblemente, GDF-5 se refiere a la forma prepro, a la forma pro o al péptido de GDF-5 maduro. Además también están englobados los fragmentos de GDF-5 que tienen esencialmente la misma actividad biológica, preferiblemente propiedades osteoinductivas. Lo más preferiblemente, dicho fragmento comprende los aminoácidos 383 a 501 de la secuencia mostrada en SEQ ID No: 3.

Las siguientes tablas muestran las secuencias de aminoácidos para BMP-2, BMP-7 y GDF-5:

BMP-2 humana (número de registro de Swiss-Prot Prim. P12643); SEQ ID No. 1:

Clave
Desde hasta
Longitud

SEÑAL

1 23
23

PROPEP

24 282
259

hBMP2

283 396
114

10	20	30	40	50	60
MVAGTRCLLA	LLLPOVLLGG	AAGLVPELGR	RKFAAASSGR	PSSQPSDEVL	SEFELRLLSM
70	80	90	100	110	120
FGLKQRPTPS	RDAVVPPYML	DLYRRHSGQP	GSPAPDHRLE	RAASRANTVR	SFHHEESLEE
130	140	150	160	170	180
LPETSGKTTR	RFFFNLSIP	TEEFITSDEL	QVFREQMQDA	LGNNSSFHHR	INIYEIIKPA
190	200	210	220	230	240
TANSKFPVTR	LLDTRLVNQN	ASRWESFDVT	PAVMRWTAQG	HANHGFFVEV	AHLEEKQGVV
250	260	270	280	290	300
KRHVRISRSL	HQDEHSWSQI	RPLLVTFGHD	GKGHPLHKRE	KRQAKHKQRK	RLKSSCKRHP
310	320	330	340	350	360
LYVDFSDVGW	NDWIVAPPGY	HAFYCHGECF	FPLADHLNST	NHAIVQTLVN	SVNSKIPKAC
370	380	390			
CVPTLSAIS	MLYLDENEKV	VLKNYQDMVV	EGCGCR		

Bibliografía

[1]

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO.

MEDLINE=89072730; PubMed=3201241;

- 5 Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitsock L. M., Whitters M.J., Kriz R. W., Hewick R. M., Wang E.A.; "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities."; Science 242:1528-1534(1988).

[2]

CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X (2,7 ANGSTROMS) DE 292-396.

MEDLINE=99175323; PubMed=10074410;

- 10 Scheufler C., Sebald W., Huelsmeyer M.; "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution."; J. Mol. Biol. 287:103-115(1999).

BMP-7 humana (número de registro de Swiss-Prot Prim.: P18075); SEQ ID No. 2:

Clave

Desde hasta

Longitud

- 15 SEÑAL
1 29
29

- 20 PROPEP
30 292
263

hBMP-7
293 431
139

10	20	30	40	50	60
MHVRLRAAA	PHSFVALWAP	LELLRSALAD	FSLDNEVHSS	FIHRRLRSQE	RREMQREILS
70	80	90	100	110	120
ILGLPHRPRP	HLQKGKHSAP	MFMLDLYNAM	AVEEGGGPGG	QGFSYPYKAV	FSTQGPPLAS
130	140	150	160	170	180
LQDSHFELTDA	DMVMSFVNLV	EHDKEFFHPR	YHHREFREDL	SKIPEGEAVT	AAEFRIYKDY
190	200	210	220	230	240
IRERFDNETF	RISVYQVLQE	HLGRESDLFL	LDSTLWASE	EGWLVEFDITA	TSNHWVNVPR
250	260	270	280	290	300
HNLGLQLSVE	TLDGQSINPK	LAGLIGRHGP	QNKQPFMVAF	FKATEVHFERS	IRSTGSKQRS
310	320	330	340	350	360
QNRSKTPKNQ	EALRMANVAE	NSSSDQRQAC	KKHELYVSFR	DLGWQDWIIA	PEGYAAYYCE
370	380	390	400	410	420
GECAFPLNSY	MNATNHAIVQ	TLVHFINPET	VPKPCCAPTQ	LNAISVLYFD	DSSNVILKKY
430					
RNMVVRACGC	H				

Bibliografía

[1]

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, Y SECUENCIA PARCIAL.

5 TEJIDO=placenta;

MEDLINE=90291971; PubMed=2357959;

Oezkaynak E., Rueger D. C., Drier E.A., Corbett C., Ridge R.J. Sampath T.K., Oppermann H.; "OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family."; EMBO J. 9:2085-2093(1990).

[2]

10 SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO.

MEDLINE=91088608; PubMed=2263636;

Celeste A.J., Iannazzi J.A., Tailor R. C., Hewick R. M., Rosen V., Wang E.A., Wozney J.M.; "Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone."; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:9843-9847(1990).

15 [3]

CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X (2,8 ANGSTROMS) DE 293-431.

MEDLINE=96149402; PubMed=8570652;

Griffith D.L., Keck P. C., Sampath T. K., Rueger D. C., Carlson W.D.; "Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily."; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:878-883(1996).

GDF-5 humano (número de registro de Swiss-Prot Prim.: P 43026); SEQ ID No. 3:

Clave

Desde hasta

Longitud

10 SEÑAL
1 27
27

PROPEP
28 381
15 354

hGDF-5
382 501
120

10	20	30	40	50	60
MRLPKLLTFL	LWYLAWLDLE	FICTVLGAPD	LGQRPQGSRP	GLAKAEAKER	PPLARNVFRP
70	80	90	100	110	120
GGHSYGGGAT	NANARAKGGT	GQTGGLTQPK	KDEPKKLPPR	PGGPEPKPGH	PPQTRQATAR
130	140	150	160	170	180
TVTPKGQLPG	GKAPPKAGSV	PSSFLLKKAR	EPGPPREPKE	PFRPPPITPH	EYMLSLYRTL

190	200	210	220	230	240
SDADRKGGNS	SVKLEAGLAN	TITSFIDKGQ	DDRGPVVRKQ	RYVFDISALE	KDGLLGAEIR
250	260	270	280	290	300
ILRKKPSDTA	KPAVPRSRRA	AQLKLSSCPS	GRQPAALLDV	RSVPGLDGSG	WEVFEDIWKL
310	320	330	340	350	360
RNFKNSAQLC	LELEAWERGR	TVDLRGLGED	RAARQVHEKA	LFLVEGRTKK	RDLEFFNEIKA
370	380	390	400	410	420
RSGQDDKTIV	EYLFSSQRRKR	RAPLATRQGG	RPSKNLKARC	SRKALHVNFK	DMGWDDWIIA
430	440	450	460	470	480
PLEYEAFFCE	GLCEFPLRSH	LEPTNHAIVQ	TLMNSMDPES	TPPTCCVPTR	LSPISILFID
490	500				
SANNVYKQY	EDMVVESCGC	R			

Bibliografía

[1]

SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO.

5 TEJIDD=placenta;

MEDLINE=95071375; PubMed=7980526;

Hoetten G., Neidhardt H., Jacobowsky B., Pohl J.; "Cloning and expression of recombinant human growth/differentiation factor 5."; Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:646-652(1994).

[2]

10 SECUENCIA DE ÁCIDO NUCLEICO.

TEJIDO= cartilago articular;

MEDLINE=95050604; PubMed=7961761;

15 Chang S., Hoang B., Thomas J. T., Vukicevic S., Luyten F. P., Ryba N. J.P., Kozak C.A., Reddi A.H., Moos M.; "Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development."; J. Biol. Chem. 269:28227-28234 (1994).

También están englobadas por la presente invención realizaciones en las que dicho agente activo se selecciona de hormonas, citocinas, factores de crecimiento, antibióticos y otras sustancias farmacológicas naturales y/o sintetizadas como esteroides, prostaglandinas, etc.

20 Preferiblemente, dicho agente activo es la hormona paratiroidea (PTH) y/o el péptido 1-34 de PTH.

En otra realización de la invención, el agente activo es una proteína "inductiva de cartilago" o "regeneradora de cartilago". Una proteína inductiva de cartilago preferida es MIA/CD-RAP (MIA, actividad inhibidora de melanoma, proteína sensible a ácido retinoico derivada de cartilago), más preferiblemente MIA/CD-RAP humana.

25 La secuencia de aminoácidos para la forma prepro de MIA/CD-RAP se deposita con el número de registro de Swiss-Prot Q16674 o se muestra en SEQ ID No. 4. Los aminoácidos 1 a 24 corresponden a la secuencia señal, los

aminoácidos 25 a 131 corresponden a la secuencia codificante.

La siguiente tabla muestra las secuencias de aminoácidos para MIA/CD-RAP:

MIA/CD-RAP humana (número de registro de Swiss-Prot Prim.: Q 16674); SEQ ID No. 4:

5 Clave
Desde hasta
Longitud

SEÑAL
1 24
24

10 hMIA/CD-RAP
25 131
107

**MARSLVCLGVIIILSAFSGPGVRRGPMPLADRKLCADQEC SHPISMAVALQDYMADPCR
FLTIIHRGQVVYVFSKLGKGRGLFWGGSVQGDYYGDLAARLGYFPSSIVREDQTLKPGKVD
VKTDKWDFYCQ**

G Preparaciones específicas y componentes opcionales

- 15 La pasta de la presente invención opcionalmente puede comprender excipientes adicionales. Estos excipientes sirven para la estabilización de la proteína o el péptido, por ejemplo, sacáridos, aminoácidos, polioles, detergentes o el mantenimiento del pH, por ejemplo, sustancias tampón. Otros componentes de la pasta de formación *in situ* podrían ser promotores del endurecimiento tales como fosfato de sodio, Na₂HPO₄ o citrato de sodio y los descritos antes adicionalmente.
- 20 Los métodos (31) a (34) de la presente invención permiten no usar disolventes orgánicos tóxicos (véase a continuación); por ejemplo, el uso de dimetilsulfóxido, anisol o ácido glacial. Sin embargo, se usan disolventes tóxicos de manera rutinaria en los métodos descritos en la técnica. Normalmente dañan la proteína durante la puesta en contacto y/o especialmente durante el secado pero tal daño se evita sorprendentemente usando la técnica de secado especial de la presente invención, porque el agente activo se adsorbe/o se une sobre el portador sólido inorgánico.
- 25 En una realización preferida del método (33) de la invención, dicho tampón tiene una concentración de tampón de 10 mmol/l para lograr una solubilidad suficiente del agente activo durante el proceso de adsorción y para evitar cualquier modificación del beta-TCP cerámico de calcio monofásico. El valor de pH de la disolución cambia de manera controlada durante el proceso de recubrimiento y secado desde pH 3 hasta pH 7. El cambio de pH provoca una reducción homogénea de la solubilidad del factor de crecimiento óseo, definido en el TCP.
- 30 El término "líquido viscoso" significa un líquido con una disminución de la fluidez en comparación con agua. Por ejemplo, un líquido viscoso según la presente invención se refiere a una consistencia semejante a la miel a la temperatura ambiental que permite una administración sencilla.
- 35 En una realización adicional preferida del método de la invención, dicha disolución que contiene tampón para el método (33) comprende un poliol y/o alcohol. Se conocen bien en la técnica alcoholes o polioles adecuados y se describen en libros de texto convencionales, tales como Römpp, dictionary of chemistry. Más preferiblemente, dicho alcohol es etanol y dicho poliol es manitol.
- En una realización más preferida, la concentración del poliol y/o alcohol es de entre el 0 y el 10% (p/v).
- 40 El término "sacáridos" engloba mono, di y polisacáridos. Se conocen bien en la técnica la estructura y composición de los mono, di y polisacáridos y se describen en libros de texto convencionales, tales como Römpp, dictionary of chemistry.
- Más preferiblemente, dicho sacárido es un disacárido. Lo más preferiblemente, dicho disacárido es sacarosa o trehalosa.
- 45 En los ejemplos adjuntos se describen medios y métodos adicionales para controlar la distribución homogénea, la cuantificación y la caracterización del agente activo.
- Sorprendentemente, los agentes activos, en particular sorprendentemente las proteínas, cuando se adsorben sobre la superficie de materiales de relleno cerámicos/portadores son mucho más resistentes frente a la degradación provocada por disolventes orgánicos que proteínas libremente disueltas o suspendidas en disoluciones orgánicas o

integradas en sistemas de emulsión bifásicos. Por tanto, este aspecto de la invención abre una nueva posibilidad para producir sistemas de administración de fármacos a base de polímeros para proteínas sin desnaturalización y/o modificación de polipéptidos en sistemas orgánicos singulares o multifásicos.

- 5 Son adecuados para uno de los dos métodos de la presente invención como agentes activos todas las proteínas, polipéptidos y fármacos de molécula pequeña. Especialmente, tales agentes activos con baja o ninguna afinidad por matrices portadoras inorgánicas pueden inmovilizarse en el material compuesto de polímero - fosfato de calcio. Preferiblemente, la unión de dicho agente activo al portador es reversible.

- 10 De ese modo, se permite la disolución de dicho agente activo una vez que la pasta se ha llevado a un entorno *in vivo* adecuado, tal como una cavidad ósea o a un entorno acuoso intramuscular o subcutáneo. La pasta de endurecimiento *in situ* se endurece mediante difusión del plastificante fuera del polímero insoluble en agua a la vez que fluidos corporales acuosos difunden al interior del polímero insoluble en agua. En consecuencia, el polímero solidifica debido a su insolubilidad en agua (Shively *et al.*, 1995).

- 15 Más preferiblemente, dicha disolución de los compuestos inmovilizados es una liberación sostenida que permite la difusión del agente activo al interior del tejido, que rodea la pasta endurecida. Por tanto, la pasta endurecida es adecuada para servir como fuente *in vivo* para, por ejemplo, proteínas osteoinductivas, péptidos, antibióticos o fármacos de molécula pequeña, que se liberan lentamente y que pueden distribuirse de ese modo eficazmente al interior de los tejidos circundantes o tener un efecto en la forma inmovilizada.

- 20 El polímero insoluble en agua y el material de relleno junto con el plastificante forman el material de la pasta de material compuesto de portador/polímero de la presente invención, que se une a un agente activo para dar como resultado la pasta de la presente invención, que permite la liberación sostenida de dicho agente activo *in vivo*, una vez que se endurece la pasta en el plazo de minutos a horas mediante difusión fuera del polímero soluble en agua (plastificante) a la vez que fluidos corporales acuosos difunden al interior del polímero. En consecuencia, el polímero solidifica debido a su insolubilidad en agua (Shively *et al.*, 1995). El tiempo hasta que se alcanza la estabilidad mecánica completa puede controlarse mediante la variación de los componentes del material del implante.

- 25 El término "tampón" que asiste en el mantenimiento del agente activo disuelto en disoluciones acuosas durante un tiempo suficiente como para permitir un "recubrimiento homogéneo" se refiere a un componente que permite que el agente activo osteoinductivo se disuelva eficazmente y se mantenga en la disolución. Este tampón puede evitar y/o equilibrar el aumento de pH provocado al poner en contacto la disolución con el portador de fosfato de calcio de modo que la proteína no precipita inmediatamente, por ejemplo, debido a un aumento de pH. Dicho tampón puede determinarse por el experto en la técnica considerando la solubilidad de la proteína osteoinductiva (lo que depende del pH y la fuerza iónica) y la influencia del portador sobre dichos parámetros tras poner en contacto el portador con dicha disolución que contiene tampón. Según la presente invención, se ha encontrado que es necesario un tampón adecuado para la distribución homogénea del agente activo sobre la superficie del portador, por ejemplo fosfato de calcio, comprendiendo preferiblemente dicho tampón un ácido débil, un alcohol y un sacárido.

35 H Aplicaciones farmacéuticas

La invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende la pasta tal como se describió anteriormente.

- 40 El producto de la presente invención puede formularse como una composición farmacéutica o un dispositivo médico. La composición de dicho producto puede comprender compuestos adicionales como estabilizadores, sustancias tamponantes y otros excipientes. La cantidad del producto de la presente invención aplicada al paciente se determinará por el médico encargado y otros factores clínicos; preferiblemente según cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, la cantidad aplicada a un paciente depende de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el momento y la vía de administración, las condiciones de salud general y otros fármacos que estén administrándose de manera concurrente. Puede monitorizarse el progreso mediante evaluación periódica. Gracias a la presente invención, es posible tener un sistema, que permite el cuidado de defectos dentales u ortopédicos mediante la adaptación óptima del material semejante a una pasta en el sitio de implantación y al mismo tiempo una liberación controlada de un agente activo.

Preferiblemente, el método de aplicación es mínimamente invasivo, aún más preferiblemente se aplica la aplicación mediante inyección.

- 50 Gracias a la presente invención, es posible tratar diversos defectos óseos incluyendo grandes cavidades de una nueva manera. En particular, las grandes cavidades no podían tratarse de manera eficaz o sólo con el uso de material de hueso autógeno. Sin embargo, debido a las propiedades osteoinductivas y/u osteoconductoras fiables y eficaces de la pasta de la presente invención o el dispositivo que puede obtenerse mediante el método de la invención, ahora se ha hecho posible el tratamiento de defectos óseos que requieren un aumento o reparación óseos extensos sin una segunda cirugía.

La invención también engloba el uso de la pasta de la invención o una pasta que puede obtenerse mediante el método de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el aumento óseo.

El término "aumento óseo" se refiere a la formación inducida de hueso, que está indicada para tratar defectos óseos, cavidades en huesos, o para tratar enfermedades y trastornos acompañados de pérdida de tejido óseo o para preparar la posterior fijación de un implante. Las enfermedades y los trastornos descritos a continuación se conocen bien en la técnica y se describen en detalle en libros de texto médicos convencionales tales como Pschyrembel o Stedman.

Preferiblemente, dicho aumento óseo sigue a defectos traumáticos, malignos o artificiales.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de la pasta de la invención o la preparación de una composición farmacéutica para tratar defectos óseos.

Más preferiblemente, dichos defectos óseos incluyen fracturas tales como fractura de radio y fractura de la cabeza de la tibia, reparación sin fractura, artrodesis vertebral, defectos de huesos largos o defectos óseos tras apicectomía, extirpación de quistes o tumores, extracción dental o extirpación quirúrgica de dientes retenidos.

La invención también se refiere al uso de la pasta de la invención para el relleno de cavidades y el soporte de regeneración tisular guiada en periodontología.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de la pasta de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la elevación del suelo sinusal, el aumento de la cresta maxilar y mandibular atrofiada y la estabilización de implantes inmediatos.

También está dentro del alcance de la presente invención un método para tratar una o más de las enfermedades a las que se ha hecho referencia según los usos de la presente invención, comprendiendo dicho método al menos la etapa de administrar la pasta de la invención en una forma farmacéuticamente aceptable a un sujeto. Preferiblemente, dicho sujeto es un ser humano.

Finalmente, la invención se refiere a un kit que comprende la pasta de la invención. Los componentes del kit se describen adicionalmente a continuación.

Las partes del kit de la invención pueden envasarse individualmente en viales u otros medios apropiados dependiendo del componente respectivo o en combinación en recipientes o unidades de múltiples recipientes adecuados. La fabricación del kit sigue preferiblemente procedimientos convencionales que conoce el experto en la técnica.

I) Beneficios de la pasta de endurecimiento *in situ* de la presente invención

Según la presente invención, pudo desarrollarse una pasta de endurecimiento *in situ* con excelente resistencia al lavado debido a un fraguado rápido, que permite que se forme la pasta premezclada tal como una pasta que contiene CPC de manera estable en un entorno húmedo (por ejemplo, indicaciones con hemorragia grave) antes de que el endurecimiento sea completo. Estas pastas premezcladas según la presente invención tienen la ventaja de que existe tiempo ilimitado para su aplicación y modulación y el polímero que contiene el material de relleno sólido insoluble en agua comienza a endurecer tras haberse expuesto a agua o fluido corporal del tejido circundante.

Gracias a la presente invención, pudo generarse una pasta de endurecimiento *in situ* moldeable, preferiblemente inyectable, de autoendurecimiento y resorbible evitando las desventajas tales como la fragilidad de las composiciones de CPC con mejores propiedades mecánicas que las composiciones de CPC convencionales.

Preferiblemente, con la selección del plastificante, tal como PEG, DMSO o glicerol, pudo mejorarse adicionalmente la resistencia mecánica tras la disipación del plastificante. Los inventores encontraron que dependiendo del polímero usado, el plastificante tiene un impacto sobre la temperatura de transición vítrea del polímero en el implante endurecido, lo que influye en la resistencia mecánica de la pasta de endurecimiento *in situ*. Este impacto es diferente para diferentes plastificantes usados. Sorprendentemente, el PEG fue el plastificante con el menor impacto sobre el polímero usado (figura 9). El DMSO, que es un plastificante preferido para disolver copolímeros de bloque debido a sus características de solubilidad es comparable al PEG en lo referente al impacto sobre la disminución de la temperatura de transición vítrea del polímero y por tanto a la resistencia mecánica de la pasta de endurecimiento *in situ*.

Además, la pasta de material compuesto de cerámica/polímero de la presente invención muestra estabilidad mecánica mejorada en comparación con sistemas de flujo convencionales que usan matrices poliméricas para la liberación retardada.

Preferiblemente, la pasta de endurecimiento *in situ* tiene una dureza del 20% en el plazo de una hora determinada mediante el método bien conocido por el experto en el campo y descrito adicionalmente en el ejemplo 12, más preferiblemente el 30% tras una hora, lo más preferiblemente el 40% en el plazo de una hora tras el contacto con un medio acuoso.

Según la presente invención, la pasta de endurecimiento *in situ* es superior con respecto a los sistemas de flujo convencionales tales como CPC (barra blanca de la figura 13) o sistemas poliméricos libres de fosfato de calcio

(barra gris de la figura 13) en lo referente a la resistencia mecánica inicial en el plazo de una hora tras haber estado en contacto con un medio acuoso o fluido corporal tal como se muestra en la figura 13.

El material del portador de material compuesto de cerámica/polímero de la presente invención muestra estabilidad mecánica mejorada en comparación con sistemas convencionales que usan matrices poliméricas para la liberación retardada. En realizaciones porosas, la matriz de material compuesto permite propiedades osteoconductoras mejoradas en comparación con sistemas de la técnica anterior debido al sistema poroso, en particular libre de poros interconectados.

El material del portador de material compuesto de cerámica/polímero de la presente invención es adecuado para sustituir gránulos poliméricos de encapsulación convencionales importantes para la liberación retardada. Debido al contenido del portador cerámico del sistema (portador cerámico más recubrimiento de polímero), la cantidad de polímero puede reducirse significativamente en comparación con sistemas de flujo convencionales totalmente a base de polímero que usan matrices poliméricas. La cantidad reducida de polímero conduce a un riesgo reducido de citotoxicidad. Un aspecto adicional de la invención es la estabilidad mecánica aumentada del material compuesto en comparación con andamiajes totalmente a base de polímero.

La invención se describirá ahora mediante referencia a los siguientes ejemplos que son meramente ilustrativos y que no limitarán el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Recubrimiento de polvo de beta-TCP con rhGDF-5

Se pipetearon 333 mg de beta-TCP y 147 μ l de rhGDF-5 en HCl 10 mM (3,4 mg/ml) sobre el beta-TCP y se absorbieron. Se incubó el polvo húmedo durante aprox. 1 hora a 25°C y se secó en una etapa de liofilización posterior.

Ejemplo 2: Preparación de un IFS (rhGDF-5/beta-TCP/PLGA/PEG 400)

Se disolvieron 167 μ l de PEG 400 y 83 mg de PLGA mediante calentamiento suave para obtener una disolución viscosa. Tras enfriamiento a temperatura ambiente, se añadieron 333 mg de polvo de beta-TCP recubierto con rhGDF-5 con agitación continua para obtener una pasta homogénea.

Ejemplo 3: Preparación del IFS (beta-TCP/PLGA /PEG 400)

Se disuelven 1 ml de PEG 400 y 500 mg de PLGA mediante calentamiento suave para obtener una disolución viscosa. Tras enfriamiento a temperatura ambiente, se añadieron 2000 mg de polvo de beta-TCP con agitación continua para obtener una pasta homogénea.

Ejemplo 4: Extracción de la proteína inmovilizada

(etapa A)

Extracción de 417 mg de muestra de prueba endurecida (1 h a 4°C) en 1 ml de disolución en cloroformo para disolver el polímero. Tras retirar la disolución en cloroformo de polímero, se eliminó el cloroformo residual en un desecador a vacío.

(etapa B)

Para la extracción de la proteína inmovilizada del beta-TCP, se sumergió la muestra resultante de la etapa A (gránulos recubiertos y libres de polímero) en urea 8 M, Tris 10 mM, EDTA 100 mM durante 1 h a 4°C.

En la etapa posterior, se centrifugó la disolución (9300* g, 3 min). Se cuantificaron el contenido en proteína y los productos de degradación en el sobrenadante mediante RP-HPLC.

Ejemplo 5: Preparación de muestras de prueba

El endurecimiento de las muestras de prueba tiene lugar mediante la sustitución del PEG por agua del fluido corporal. En condiciones fisiológicas simuladas, se representó el fluido corporal mediante solución salina tamponada con fosfato (PBS). Tras colar la pasta a un molde hueco, posteriormente se endureció la pasta mediante incubación del molde hueco en PBS durante la agitación suave del PBS para soportar la difusión del PEG lejos de la muestra de prueba. Se alcanzó la dureza final ya después de tres horas a temperatura ambiente.

Ejemplo 6: Propiedades mecánicas mejoradas mediante la variación del tamaño de grano de beta-TCP

Se usaron diferentes tamaños de grano:

- beta-TCP de aproximadamente 10 - 100 μ m

- beta-TCP de aproximadamente 100 - 300 μm
- beta-TCP de aproximadamente 10 μm

Ejemplo 7: Propiedades mecánicas mejoradas mediante la variación del contenido en polímero

- 5 Se preparan las diferentes pastas mediante la variación del método descrito en el ejemplo 3. Para fabricar muestras de prueba, se endureció la pasta según el ejemplo 5. Se determinó la estabilidad mecánica tal como se describe en el ejemplo 9.

Tabla 1: composición de la pasta:

14% de PLGA	29% de PEG	57% de beta-TCP
18% de PLGA	29% de PEG	53% de beta-TCP
21% de PLGA	29% de PEG	50% de beta-TCP
25% de PLGA	29% de PEG	46% de beta-TCP

Tabla 2: composición de las muestras de prueba endurecidas:

20% de PLGA	80% de beta-TCP
25% de PLGA	75% de beta-TCP
30% de PLGA	60% de beta-TCP
35% de PLGA	55% de beta-TCP

Ejemplo 8: Propiedades mecánicas mejoradas mediante la variación del contenido en polímero

- 10 Se usaron diferentes calidades de PLGA para fabricar los cuerpos de prueba

Tipo de PLGA	Peso molecular [g/mol]
20% de PLGA (Resomer® RG 503 H)	34000
20% de PLGA (Resomer® RG 502 H)	18600

Ejemplo 9: Determinación del tamaño de poro y orientación de poro

- 15 Durante el endurecimiento de las muestras de prueba según el ejemplo 5, se forma la porosidad estructurada. Se determinaron el tamaño de poro y la orientación de poro mediante la composición de la pasta mediante el contenido del plastificante soluble en agua. Se sometieron a prueba y se analizaron diversas formulaciones. Se analizaron el tamaño de poro y la estructura mediante microscopía óptica y mediante microscopía electrónica de barrido de diversas secciones transversales a través de las muestras de prueba.

Se formaron los poros de interconexión estructurados en la dirección al tejido circundante. Se determinó el tamaño de poro. Los poros estructurados permiten un rápido movimiento celular dirigido al interior del núcleo del andamiaje para soportar la sustitución y la vascularización acelerada con nuevo tejido.

- 20 Ejemplo 10: Selección de diferentes composiciones analizadas del IFS

polímero	[% (peso)]	disolvente orgánico	[% (peso)]	material de relleno inorgánico	[% (peso)]	agente de formación de poros	[% (peso)]
PLGA RG 503H	11,0	PEG 400	44,5	CPC	44,5	-	-
	16,0		60,0		24,0		
	19,4		44,5		36,1		
	20,0		50,0		30,0		
	22,2		44,5	β -TCP	33,3	CMC	1,0
			44,5	α -TCP	33,3		
	22,0		44,0	CPC	33,0		
			44,5		33,3	-	-
	22,0		44,1		33,0	Polvo de PEG 4000	0,9
						PEG 4000 disuelto	0,9
	22,0		44,1		32,3	PEG 4000 disuelto	3,0
	21,5		43,2			Polvo de PEG 10000	0,9
	22,0		44,1		33,0	PEG 10000 disuelto	0,9
	22,0		44,1		33,0	PEG 10000 disuelto	0,9

	21,5		43,2		32,3	PEG 10000 disuelto	3,0
	22,0		44,1		33,1	NMP	0,8
	21,1		42,3		31,6	CaSO ₄	5,0
	18,4		37,0		27,6	NaCl	17,0
	18,4		37,0		27,6	sacarosa	17,0
	22,0		44,0		33,0	quitosano	1,0
	21,6		43,4		32,5		2,5
	21,1		42,3		31,6		5,0
	22,0		44,0		33,0	Polvo de PVP	1,0
	21,6		43,4		32,5	Polvo de PVP	2,5
	21,1		42,3		31,6	Polvo de PVP	5,0
	22,0		44,0		33,0	Pluronic F68	1,0
	22,2		44,4		33,3	Tween 80	0,1
	22,0		44,0		33,0		1,0
	21,8		43,7		32,7		1,8
	21,6		43,4		32,5		2,5
	21,1		42,3		31,6		5,0
	25,0				30,5		
	38,8				16,7	-	-
PLGA RG 503H	21,5		43,2		32,3		1,0/2,0
	21,3		42,7		32,0		2,0/2,0
	21,1	PEG 400	42,3		31,6	NaHCO ₃ /NaH ₂ PO ₄	2,0/3,0
	20,9		41,8		31,3		3,0/3,0
	20,9		41,8		31,3		4,0/2,0
	20,4		40,9		30,7		5,0/3,0
PLGA RG 503							
PLGA RG 502	22,2	PEG 400		CPC	33,3	-	-
PLGA RG 756			44,5				
Copolímero de dibloque de PLGA/PEG	3,8				44,1		
	7,6	DMSO			47,9		
	11,4				51,7		
PLGA RG 503H	22,2	NMP	44,5		33,3	-	-

RG503H; PLGA; composición de polímero: 48-52% molar de D,L-Lactida y 48-52% molar de glicolida; viscosidad inherente: 0,32-0,44 dl/g, 25°C, al 0,1% en CHCl₃; (Boehringer, Ingelheim)

RG502H; PLGA; composición de polímero: 48-52% molar de D,L-Lactida y 48-52% molar de glicolida; viscosidad inherente: 0,16-0,24 dl/g, 25°C, al 0,1% en CHCl₃; (Boehringer, Ingelheim)

- 5 RG503; PLGA; composición de polímero: 48-52% molar de D,L-Lactida y 48-52% molar de glicolida; viscosidad inherente: 0,32-0,44 dl/g, 25°C, al 0,1% en CHCl₃; (Boehringer, Ingelheim)

RG502; PLGA; composición de polímero: 48-52% molar de D,L-Lactida y 48-52% molar de glicolida; viscosidad inherente: 0,16-0,24 dl/g, 25°C, al 0,1% en CHCl₃; (Boehringer, Ingelheim)

Ejemplo 11: Preparación del IFS

- 10 Inicialmente, se pesó la cantidad obligatoria de disolvente orgánico en un crisol de porcelana. En una segunda etapa, se añadió el polímero. Se homogeneizaron estos dos componentes y se calentaron a una temperatura de aproximadamente 60°C hasta que se disolvió por completo el polímero en el disolvente orgánico. Posteriormente, se dispersaron el material de relleno inorgánico (por ejemplo, TCP o un cemento de fosfato de calcio por ejemplo que consistía en el 62,5% en peso de alfa-fosfato de tricalcio, el 26,8% en peso de fosfato de dicalcio anhidro (DCPA), el 8,9% en peso de carbonato de calcio (CaCO₃) y el 1,8% en peso de hidroxiapatita (HA) y opcionalmente otros excipientes (por ejemplo, agentes de formación de poros como la sal de sodio de carboximetilcelulosa) en la disolución polimérica.
- 15

Ejemplo 12: Ensayos mecánicos del IFS (y sistemas relacionados)

El IFS en su forma pastosa, preparado tal como se describe en el ejemplo 11, se transfirió a una jeringa. De ese modo, se facilitó el llenado de la formulación en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se transfirió la placa de 96 pocillos, que contenía la muestra pastosa de los IFS (150 - 200 mg por pocillo), a un baño de incubación, que permaneció de manera constante a 37°C para simular las condiciones fisiológicas, mientras que tampón PBS sirve como medio de incubación. En tiempos predefinidos, se retiró la placa de 96 pocillos del baño de incubación para llevar a cabo los ensayos mecánicos. Se sometió a ensayo la dureza de las muestras usando un aparato TH 2730 (Fa Thuemter). Sustancialmente, esta máquina consiste en una herramienta de punzonado metálica, que permite aplicar fuerzas de compresión sobre las muestras y un transductor LVDT, que sirve para controlar y medir la fuerza aplicada y para determinar la distancia cubierta durante la medición. Antes de someterse a ensayo las diferentes muestras, ha de definirse la altura (h_1) de un pocillo, que no contiene ninguna muestra. Por tanto, se fijó el punto de partida de la herramienta de punzonado para las siguientes mediciones. La determinación real de la dureza de las muestras engloba dos etapas. En una primera medición, ha de determinarse la altura de la muestra particular (h_2), mientras que la velocidad de la cruceta de la herramienta de punzonado era de 40 mm por minuto y la fuerza aplicada se limitó a 0,2 N. Se llevó a cabo una segunda medición para determinar la distancia (d) cubierta por la herramienta de punzonado dentro de la muestra durante un periodo de 30 segundos, mediante lo cual la fuerza aplicada se mantuvo constante a 20 N. Se calculó la dureza de la muestra de la siguiente manera:

$$\text{dureza [\%]} = (h_2 - d) / h_2 * 100\%$$

El método descrito se basaba en la determinación de la dureza según Shore (norma DIN 53505).

Ejemplo 13: Preparación del IFS (con un agente activo, para pruebas *in vitro*, que requieren condiciones estériles)

Las materias primas han de esterilizarse de un modo apropiado. Inicialmente, se pusieron 500 mg de α -TCP (tamaño de gránulo de 100 - 350 μ m) en forma seca en un vidrio 2R. Se diluyó la disolución madre de rhGDF-5 (3,4 mg/ml en HCl 10 mM) hasta 0,54 μ g/ml con los medios del tampón de recubrimiento correspondiente. Se pipetearon 475 μ l de la disolución de rhGDF-5 obtenida de esa manera sobre el α -TCP y se absorbieron. Se incubó el granulado húmedo durante 1 hora a 25°C y luego se liofilizó. Si se usó α -TCP solo como material de relleno inorgánico, se dispersaron los gránulos recubiertos directamente y con precisión en la disolución del polímero biodegradable (por ejemplo, PLGA RG 503H). Si no, se unieron los gránulos recubiertos con otros compuestos de calcio para formar un CPC, que por su parte, se dispersó con precisión en la disolución del polímero biodegradable.

Ejemplo 14: Pruebas de estabilidad de gránulos recubiertos con rhGDF-5 y rhBMP-2 en diferentes disolventes orgánicos

Se usaron disolventes tales como polietilenglicol 400, N-metilpirrolidona (NMP) y acetona. Se prepararon las muestras así como las referencias mediante el recubrimiento de 500 mg de β -TCP con la proteína respectiva (rhGDF-5 o rhBMP-2) para lograr una concentración final de 500 μ g/g de β -TCP. Después de eso, se añadieron 425 μ l del disolvente respectivo a cada muestra, mientras que las referencias se dejaron sin tratar. Tras la incubación durante 24 horas a una temperatura de 25°C, se extrajeron tanto las muestras como las referencias a 4°C durante una hora con 3 ml de un tampón de extracción, que consistía en urea (8 M), Tris (10 mM) y EDTA (100 mM), cuyo nivel de pH se ajustó a 6,7 con ácido clorhídrico. Tras esta etapa de extracción, se centrifugaron todas las muestras y referencias durante 3 minutos con 4500 rpm. Posteriormente, se diluyó el sobrenadante con disolvente A (ácido trifluoroacético al 0,15% y acetonitrilo al 20% en agua) en una razón de 1:1. El disolvente B se componía de ácido trifluoroacético al 0,15% y acetonitrilo al 84% en agua. Se llevó a cabo la caracterización de las proteínas, usando una columna Vydac C18, 2,1 x 250 mm a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Se registró el perfil de elución midiendo la absorbancia a 220 nm. Se calcularon las cantidades de rhGDF-5, rhBMP-2 y sus productos de degradación a partir del área de pico a 220 nm.

Ejemplo 15: Estudios de liberación de rhGDF-5

Se transfirieron muestras preincubadas (preparación descrita en el ejemplo 11), cuyo peso estaba bien definido (150-300 mg), a un tubo de 50 ml, que contenía 48 ml de medio (α -MEM con FCS al 10%). Se llevaron a cabo los estudios de liberación a una temperatura de 4°C. La etapa de preincubación era necesaria para obtener muestras de una forma constante para eliminar cualquier influencia de alteración de las superficies sobre la tasa de liberación de rhGDF-5 a partir de las formulaciones.

Ejemplo 16: Cuantificación de la liberación de rhGDF-5

Se cuantificó la liberación de rhGDF-5 por medio de ELISA. Inicialmente, se fijó el anticuerpo aMP-5 para rhGDF-5 sobre la superficie de una placa de microtitulación. Tras haber saturado los sitios de unión libres, se incubó la placa con las muestras que contenían rhGDF-5. Posteriormente, se incubó el rhGDF-5 unido con el anticuerpo aMP4, que se cuantificó por medio de reacción inmunitaria con estreptavidina-POD.

Ejemplo 17: Extracción del rhGDF-5 inmovilizado

Se extrajo el rhGDF-5 inmovilizado por medio de un tampón de extracción, que consistía en urea (8 M), Tris (10 mM) y EDTA (100 mM). Se ajustó el nivel de pH a pH 6,7 con ácido clorhídrico. Se transfirieron 500 mg de gránulos de TCP recubiertos (500 mg de rhGDF-5/g de TCP) a un tubo de 15 ml y se suspendieron en 3 ml de tampón de extracción. Posteriormente, se incubaron los gránulos durante 60 minutos a 4°C. Finalmente, se centrifugó el sobrenadante y se diluyó con disolvente A en una razón de 1:1. Esta disolución sirve para la caracterización y cuantificación de rhGDF-5 mediante RP-HPLC.

Ejemplo 18: Cuantificación de rhGDF-5 en disolución mediante RP-HPLC

Se determinó el contenido de rhGDF-5 contenido mediante análisis de fase inversa (RP-HPLC). Se analizaron alícuotas de la muestra usando una columna Porous 10 R1 C4 (autoempaquetada). Se usaron ácido trifluoroacético al 0,045% en agua (disolvente A) y ácido trifluoroacético al 0,025% en acetonitrilo al 84% (disolvente B) como disolventes a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. Se registró el perfil de elución midiendo la absorbancia a 220 nm. Se calcularon las cantidades de rhGDF-5 a partir del área de pico a 220 nm usando una curva patrón.

Ejemplo 19: Caracterización de rhGDF-5 en disolución mediante RP-HPLC

Se llevó a cabo la caracterización de rhGDF-5 y sus posibles modificaciones por medio de RP-HPLC. Se analizaron alícuotas de la muestra usando una columna Vydac C18, 2,1 x 250 mm. Se usaron ácido trifluoroacético al 0,1% en agua (disolvente A) y ácido trifluoroacético al 0,15%-acetonitrilo (disolvente B) como disolventes a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. Se registró el perfil de elución midiendo la absorbancia a 220 nm. Se calculó el contenido relativo de rhGDF-5 a partir del área de pico a 220 nm.

Ejemplo 20: Análisis del IFS mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se sometieron las muestras endurecidas y secadas a vacío a deposición catódica con carbono. De ese modo, se aplicó un vacío de aproximadamente 10^{-4} mbar. Las estructuras objetivo para estos análisis fueron la superficie y el núcleo de la muestra particular de los IFS y especialmente la porosidad presentada por estas estructuras.

Ejemplo 21: Análisis del IFS mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se secaron las muestras a vacío. Se pesaron con precisión 10-20 mg de las muestras y se analizaron, mientras que las velocidades de calentamiento y enfriamiento fueron de entre 10 y 30 K/min. Se llevó a cabo el enfriamiento por medio de nitrógeno líquido.

Ejemplo 22: Análisis del IFS mediante microscopía óptica

Se prepararon las muestras mediante incubación de la formulación de IFS pastosa en tampón PBS durante al menos 48 horas. Para lograr una forma reproducible de las muestras endurecidas de los IFS, se dosificaron 1,5 g (por muestra) de la formulación pastosa a un pocillo de una placa de 24 pocillos. Tras haberse terminado la incubación, se retiraron las muestras de los pocillos particulares y se secaron a vacío. Las estructuras objetivo para estos análisis fueron la superficie y el núcleo de las muestras particulares de los IFS y especialmente la porosidad presentada por estas estructuras. Se contó el número de poros. Se midió el tamaño de poro de los poros contados por medio del software denominado Soft Imaging Systems®. Estos datos sirvieron para el cálculo del tamaño de poro promedio, la desviación estándar relacionada y para la determinación de la distribución del tamaño de poro.

Tabla 3 muestra el impacto de diferentes tamaños de partícula de la sal de sodio de carboximetilcelulosa (NaCMC) sobre la distribución del tamaño de poro en la superficie y en el núcleo del IFS

estructura analizada:	superficie	núcleo	superficie	núcleo	superficie	núcleo	superficie	núcleo
Concentración de NaCMC [% en peso]:	0	0	1	1	1	1	1	1
Tamaño de partícula de NaCMC:	-		25-1000 μm		25-71 μm		900-1000 μm	
Área analizada [mm^2]	59,0	29,5	59,0	29,5	59,0	29,5	59,0	29,5
Número de poros:	6	68	31	47	41	95	13	59
Tamaño de poro promedio [μm]	104	641	313	523	83	292	233	348
Tamaño de poro mínimo [μm]	20	174	81	168	13	34	34	87
Tamaño de poro máximo [μm]	228	1497	980	3960	705	1550	738	3369
Desviación estándar [μm]	72	206	200	538	146	177	236	423
< 200 μm :	5	1	11	3	37	28	7	19
201-400 μm :	1	6	10	17	2	52	3	27
401-600 μm :	0	19	10	17	1	13	1	11
601-800 μm :	0	29	0	8	1	1	2	0
801-1000 μm :	0	9	0	1	0	0	0	1

> 1000 µm:	0	4	0	1	0	1	0	1
------------	---	---	---	---	---	---	---	---

IFS - composición (sin NaCMC): PLGA RG 503H (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso),

- 5 IFS - composición (con NaCMC): PLGA RG 503H (22% en peso) cemento de fosfato de calcio (33% en peso), polietilenglicol 400 (44% en peso), NaCMC (1% en peso)

Ejemplo 23: Determinación de la densidad del IFS y sistemas relacionados

- 10 Se llenó un molde hueco con un volumen definido con las formulaciones particulares. Se determinó por tanto la masa de la fractura de la formulación que se requería. Así se calculó la densidad como la razón de masa y volumen (g/ml). Se muestran los datos en la tabla 3. Mediante la adición de un material de relleno inorgánico a la pasta de endurecimiento *in situ*, puede reducirse considerablemente la cantidad de polímero insoluble en agua con relación al volumen del defecto, aproximadamente en un tercio a diferencia de los implantes a base de polímero convencionales. Esto influye en el valor de pH local dentro del tejido o sitio del defecto y evita reacciones en el sitio tóxicas o adversas debidas a la disminución del pH durante degradación del polímero dentro del organismo.

Tabla 4 muestra la determinación del contenido de PLGA en un volumen del defecto definido

	IFS	IFS (CMC)	disolución de polímero libre de CaP	disolución de polímero libre de CaP (CMC)
densidad [g/ml]	1,38	1,46	1,07	1,17
contenido de PLGA* [% en peso]	22,2	22,0	45,0	44,6
masa de PLGA en 1 ml de defecto** [g]	0,31	0,32	0,48	0,52

- 15 1. IFS:PLGA RG 503H (22,2% en peso), cemento de fosfato de calcio (33,3% en peso), polietilenglicol 400 (44,5% en peso)
2. IFS(CMC):PLGA 503H(22,0% en peso),cemento de fosfato de calcio (33,0% en peso), polietilenglicol 400(44,0% en peso), sal de sodio de carboximetilcelulosa (1,0% en peso)
3. Disolución de polímero libre de CaP:PLGA RG 756 (45,0% en peso), N-metilpirrolidona (55,0% en peso)
- 20 4. Disolución de polímero libre de CaP(CMC):PLGA RG 756 (44,6% en peso), N-metilpirrolidona (54,4% en peso), sal de sodio de carboximetilcelulosa (1,0% en peso), * en la formulación antes de la aplicación, ** tras endurecimiento

Bibliografía:

- 25 Agrawal, C. M. *et al.* (1997); "Technique to Control pH in Vicinity of Biodegrading PLA-PGA Implants"; J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.) 38: 105-114.
- Bohner, M. (2001); Eur Spine J 10: S114-121.
- Bohner, M; Baroud, G. (2004); Biomaterials 26: 1553-1563.
- Breitenbach, J. (2002); "Melt extrusion: from process to drug delivery technology", Eur. J. Pharm. Biopharm. 54: 107-117.
- 30 Celeste A. J. *et al.* (1990) "Identification of transforming growth factor--" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 87: 9843-9847.
- Chang, S. *et al.* (1994); "Cartilage-derived morphogenetic proteins..." J. Biol. Chem. 269:28227-28234.
- Cherng, A. *et al.* (1997); J Biomed Mater Res 35: 273-277.
- Chow, L. C. (2000); Mater Res Symp Proc 599: 27-37.
- Del Real, R. P. *et al.* (2002); Biomaterials 23: 3673-3680.
- 35 Draenert, K. *et al.* (2001); Trauma Berufskrankh. 3: 293-300.
- Driessens, F. C.M. *et al.* (2002); "The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements." Biomaterials 23: 4011-4017.

- Dunn *et al.* patente estadounidense 5.702.716.
- Durucan, C. *et al.* (2000); "Calcium-deficient hydroxyapatite-PLGA composites: mechanical and microstructural investigation." *J. Biomed. Mater. Res.* 51: 726-724.
- EMA, ICH Topic Q 3 C, Impurities: Residual Solvents.
- 5 Friess, W. *et al.* (1998); *Pharm. Dev. Technol.* 4: 387-396.
- Friess, W. (1999); "Collagen - biomaterial for drug delivery." *Eur J Pharm Biopharm* 45: 113-136.
- Gao, T. *et al.* (1996); *Int. Orthopaedics* 20: 321- 325.
- Gombotz, W. *et al.* (1996) en *Formulation, characterization and stability of protein drugs*, Plenum Press, Nueva York, USA, págs. 219 - 245.
- 10 Griffith, D. L. *et al.* (1996); "Three-dimensional structure of recombinant human..." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 93: 878-883.
- Herbert, P. *et al.*, (1998); "A large scale process to produce microencapsulated Proteins." *Pharm Res.* 15: 357-361.
- Hoetten, G. *et al.* (1994); "Cloning and expression of recombinant human growth/differentiation factor 5." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 646-652.
- 15 Hollinger, J.O. *et al.* (1996); "Poly(α -hydroxy acids) : carriers for bone morphogenetic proteins." *Biomaterials* 17: 187-194.
- Hotz, G. *et al.* (1994); *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 23: 413-417.
- Ignjatovic, N. L. *et al.* (1999); *Biomaterials* 20: 809-816.
- Katagiri, T. *et al.* (1990); *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172: 295-299.
- 20 Kenley, R. A., *et al.* (1993); *Pharm. Res.* 10: 1393-1401.
- Li, S.M., *et al.* (1990); "Structure-property relationship in the case of the degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids) in aqueous media part. Part 1: poly(DL-lactic acid), *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1, 123-130
- Lind, M. *et al.* (1996); *J. Orthopaedic Res.* 14: 343-350.
- Lind, M. (1996); *Acta. Orthop. Scand.* 67: 407-417.
- 25 Middleton, J.C. *et al.* (2000); "Synthetic biopolymers as orthopedic devices." *Biomaterials* 21: 2335-2346.
- Nishitoh, H. *et al.* (1996); *J Biol. Chem.* 271: 21345-21352.
- Oezkaynak, E. *et al.* (1990); "OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family." *EMBO J.* 9: 2085-2093.
- Rueger, J. M. *et al.* (1996); "Knochensatzmittel"; *Unfallchir.* 99: 228-236.
- 30 Ruhe, P. Q., *et al.* (2003); *J Bone Joint surgery* 85-A (3): 75-81.
- Seeherrmann, H., *et al.* (2002); "Bone morphogenetic protein delivery systems"; *Spine* 15 (16 Supl. 1): S16-23. Review.
- Seeherrmann, H., *et al.* (2003); "A Review of Preclinical Program Development for Evaluation Injectable Carriers for Osteogenic Factors." *J Bone Joint surgery* 85-A(3): 96-108.
- 35 Scheufler, C. *et al.* (1990); "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution." *J Mol Biol.* 287: 103-115.
- Schiller, C. *et al.* (2003); "Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters." *Biomaterials* 24: 2037-2043.
- Schmidmaier, G. *et al.* (2000); "Local liberation of IGF-I and TGF-beta 1 from a biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants accelerates fracture healing." *Chirurg* 71: 1016-1022.
- 40 Schmitt, J. *et al.* (1999); *J. Orthop. Res.* 17: 269-278.
- Seeherrman, H. (2003); "A review of preclinical program development for evaluating in injectable carriers for

osteogenic factors." J. Bone. Joint. Surg. Am. 85-A: Suppl. 3, 96-108.

Shively M. L. *et al.* (1995); "Physico-chemical characterization of a polymeric injectable implant delivery system." J. Controlled Rel. 33: 237-243.

Shore, E. M. *et al.* (1997); "Human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) genomic DNA sequence".

5 Storm & Kingsley (1999); Development. Biology, 209:11-27.

Takagi, S. *et al.* (2003); J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 67B: 689-696.

Terheyden, H. *et al.* (1997); Mund Kiefer Gesichtschir. 1: 272-275.

Tormälä, P. *et al.* (1995); "Biodegradable polymers in orthopaedics: experimental and clinical." Mat. Clin. Appl. 639-651.

10 Tormälä, P. *et al.* (1992); "Biodegradable self reinforced composite materials; manufacturing structure and mechanical properties." Clin. Mater. 10: 29-34.

Vert, M. (1989); "Bioresorbable polymers for temporary therapeutic applications." Angew. Makromol. Chem. 166/167: 155-168.

15 Wang, E. A. *et al.* (1990); "Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 87: 9843-9847.

Wang, Z. G. *et al.* (2000). Polymer 41: 621-628.

Wintermantel, E. *et al.*, Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren, página 7, 511, 3. Auflage, Springer 2002, ISBN 3-540-41261-1.

Wozney, J. M. *et al.* (1998); Clin. Orthop. 346: 26-37.

20 Wozney, J.M. *et al.* (1988); Science 242: 1528-1534.

Xu, H. H.R.; Quinn, J.B. (2001); J Biomed Mater Res. 57: 457-466.

Xu, H. H.R. *et al.* (2002); J Dent Res. 81: 219-224.

Lista de secuencias

<110> Scil Technology GmbH

<120> Pasta de endurecimiento *in situ*, su fabricación y uso

<130> EP31498EP

5 <150> EP4013668.1

<151> 09-06-2004

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

10 <211> 396

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

15

Met	Val	Ala	Gly	Thr	Arg	Cys	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Pro	Gln	Val
1				5					10						15
Leu	Leu	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Pro	Glu	Leu	Gly	Arg	Arg	Lys
			20					25					30		
Phe	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Ser	Ser	Gln	Pro	Ser	Asp	Glu
		35					40					45			
Val	Leu	Ser	Glu	Phe	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Met	Phe	Gly	Leu	Lys
	50					55					60				
Gln	Arg	Pro	Thr	Pro	Ser	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Pro	Pro	Tyr	Met	Leu
65					70					75					80
Asp	Leu	Tyr	Arg	Arg	His	Ser	Gly	Gln	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Pro	Asp
				85					90					95	
His	Arg	Leu	Glu	Arg	Ala	Ala	Ser	Arg	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Ser	Phe
			100					105					110		
His	His	Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Thr	Ser	Gly	Lys	Thr
		115					120					125			
Thr	Arg	Arg	Phe	Phe	Phe	Asn	Leu	Ser	Ser	Ile	Pro	Thr	Glu	Glu	Phe
	130					135					140				
Ile	Thr	Ser	Ala	Glu	Leu	Gln	Val	Phe	Arg	Glu	Gln	Met	Gln	Asp	Ala
145					150					155					160
Leu	Gly	Asn	Asn	Ser	Ser	Phe	His	His	Arg	Ile	Asn	Ile	Tyr	Glu	Ile

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una pasta de endurecimiento *in situ* que comprende:
 - un plastificante, que es un líquido orgánico biocompatible soluble en agua o miscible en agua,
 - un polímero insoluble en agua, que es biocompatible, biodegradable, y/o biorresorbible y soluble en el plastificante,
 - un material de relleno sólido insoluble en agua, que es insoluble en el plastificante,
 - en la que la pasta, que es inyectable y estable en su envase, es capaz de endurecerse *in situ* para formar un implante sólido tras el contacto con el medio acuoso o fluido corporal,
 - en la que dicho plastificante es polietilenglicol (PEG) 400, PEG 200, PEG 300, PEG 600, 1,3-butanodiol, aceite de ricino, N-metil-2-pirrolidona, 2-pirrolidona, alcanos C2 a C6, propilenglicol, solcetal, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, lactato de etilo, metil etil cetona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilsulfona, tetrahidrofurano, caprolactama, decilmethylsulfóxido, ácido oleico, carbonato de propileno, triacetina, N,N-dietil-m-toluidina, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona o mezclas de los mismos.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el polímero insoluble en agua es poli(alfa-hidroxiácidos), poli(ortoésteres), poli(anhidridos), poli(aminoácidos), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLLA), poli(D,L)-ácido láctico (PDLLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), copolímeros de poli(ácido láctico-co-glicólico)-polietilenglicol (PLGA-PEG), poli(ácido 3-hidroxi-butírico) (P(3-HB)), poli(ácido 3-hidroxi-valérico) P(3-HV), poli(p-dioxanona) (PDS), poli(épsilon-caprolactona) (PCL), polianhidrido (PA) polioéster, polietileno (PE), polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), polilactina, poliamida (PA), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poli(metacrilato de hidroximetilo) (PHEMA), poli(cloruro de vinilo) (PVC), poli(alcohol vinílico) (PVA), politetrafluoretileno (PTFE), polieteretercetona (PEEK), polisulfona (PSU), polivinilpirrolidona, poliuretano, polisiloxano, o copolímeros, terpolímeros, copolímeros de bloque, combinaciones o mezclas de los mismos.
3. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 2, que comprende además una cantidad eficaz de un material de relleno generador de poros soluble en agua.
4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que el material de relleno generador de poros soluble en agua comprende uno o más de un
 - agente de hinchamiento, preferiblemente derivados de celulosa;
 - tensioactivo, preferiblemente copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno; o
 - agente porógeno tal como trehalosa, manitol, sacarosa, sorbitol, aminoácidos fisiológicos, por ejemplo glicina, glutamina, arginina, citrato de sodio, succinato de sodio y fosfatos de sodio, cloruro de sodio, polivinilpirrolidona (PVP), PEG sólidos tales como PEG 4000, PEG 10000, hidrogenocarbonato de sodio, sulfato de calcio o quitosano; o
 - gas o agente de formación de gas tal como carbonato de calcio o hidrogenocarbonato de sodio.
5. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 3 y 4, en la que el material de relleno generador de poros soluble en agua comprende alginato de sodio, amilasa, amilopectina, almidón, ácido hialurónico, hialuronato de sodio, gelatina, colágeno, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, sal de calcio de carboximetilcelulosa, hidroxilpropil-metilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxil-etilcelulosa, hidroxietilcelulosa o metilhidroxietilcelulosa.
6. Composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el material de relleno sólido insoluble en agua es
 - (a) un compuesto inorgánico,
 - (b) un compuesto orgánico.
7. Composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además un agente activo, siendo dicho agente activo
 - (a) BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15 o BMP-16,
 - (b) GDF-1, GDF-2, GDF-3, GDF-4, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10 o GDF-11
 - (c) CD-RAP.

8. Composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en
- (a) rellenar cavidades
 - (b) soportar la regeneración tisular guiada en periodontología,
 - (c) tratar una enfermedad discal traumática o degenerativa,
 - 5 (d) artrodesis vertebral
 - (e) tratar una fractura del cuerpo vertebral,
 - (f) vertebroplastia o
 - (g) cifoplastia.

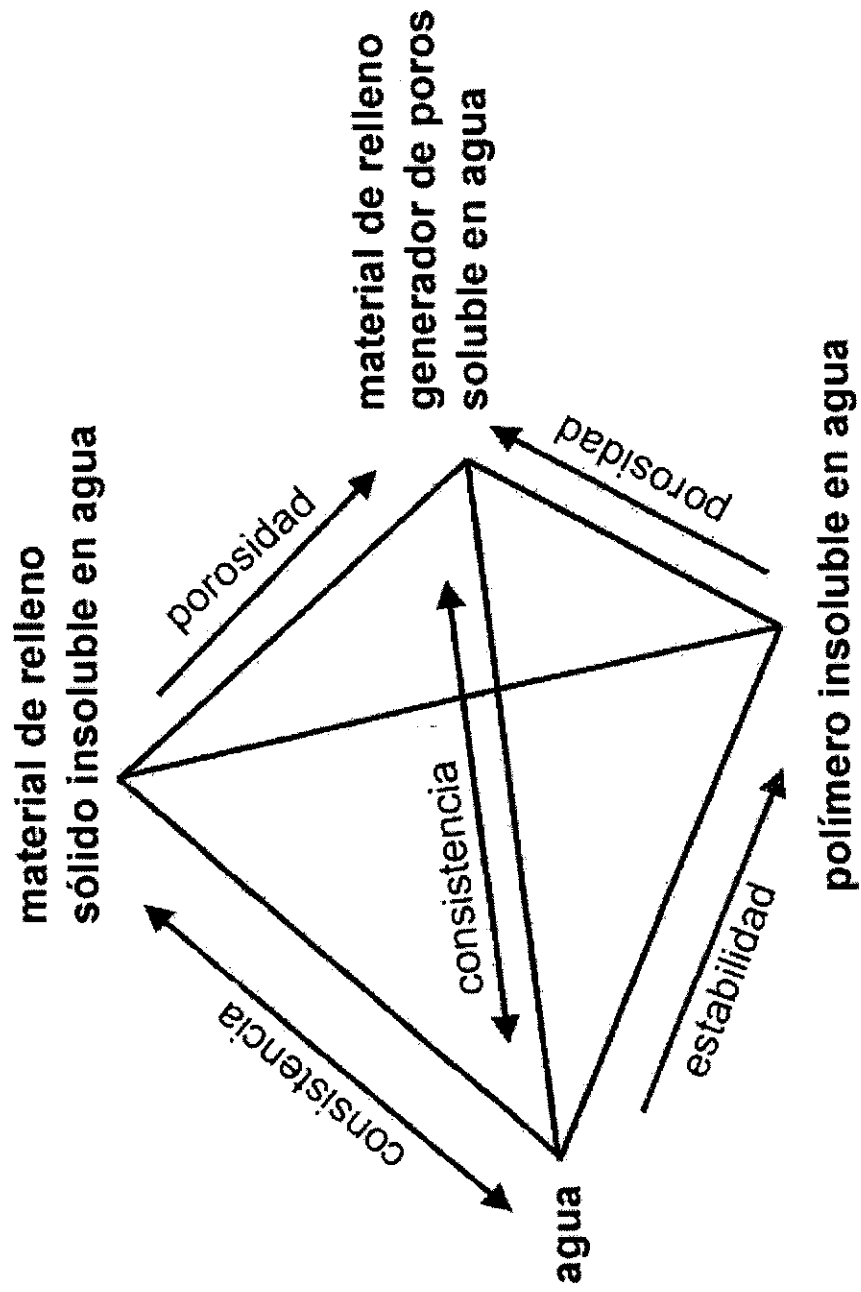


Fig. 1/18

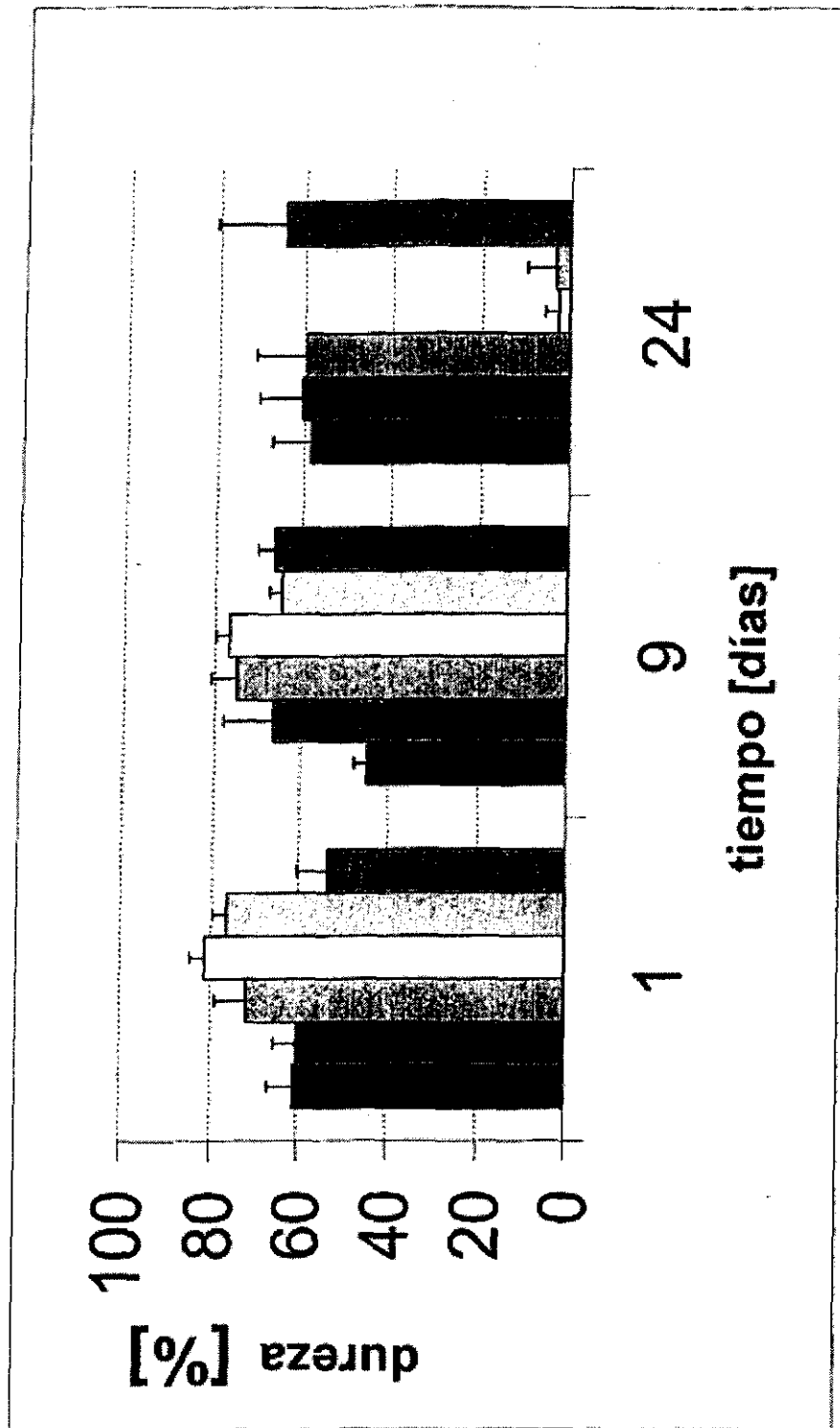


Fig. 2/18

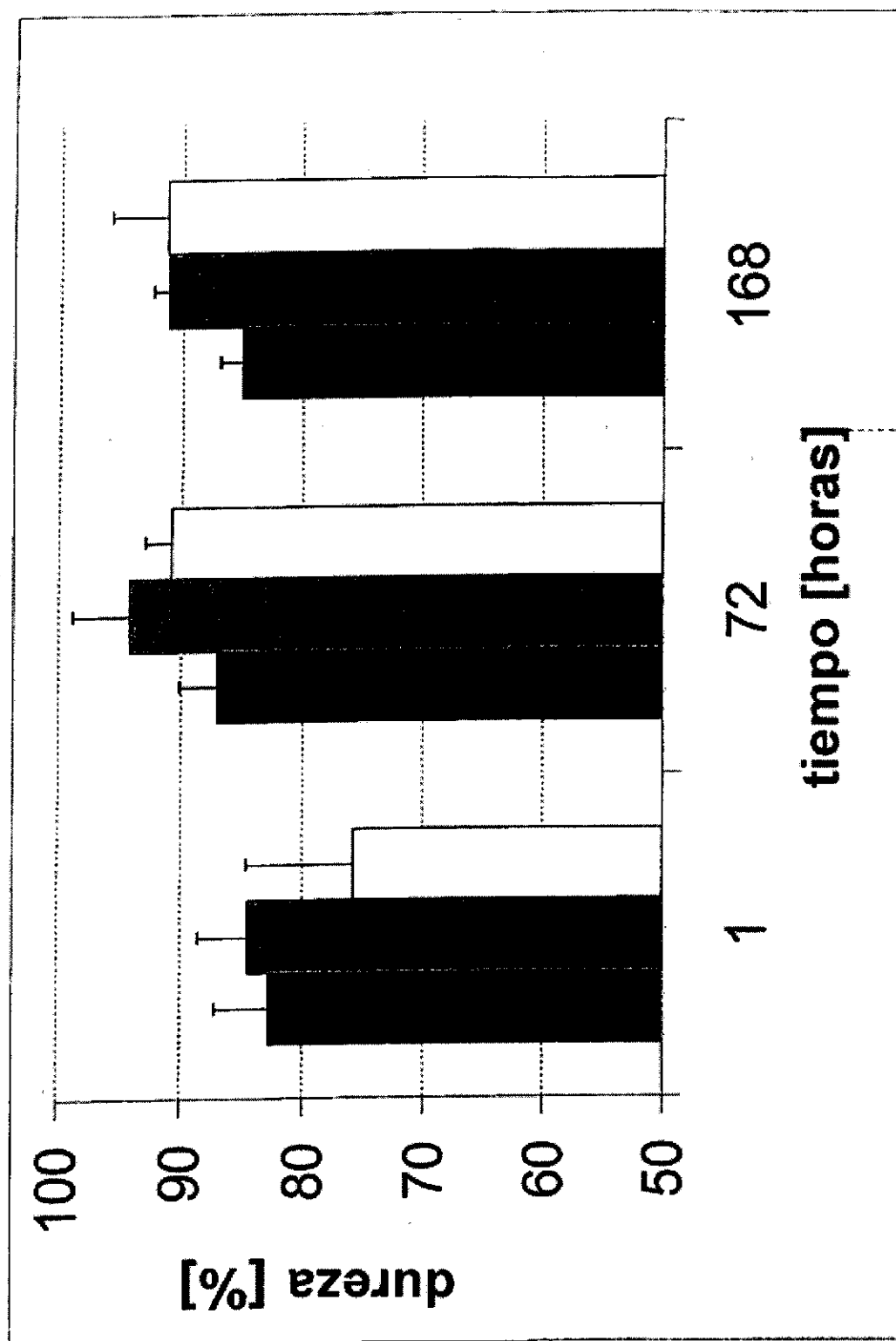


Fig. 3/18

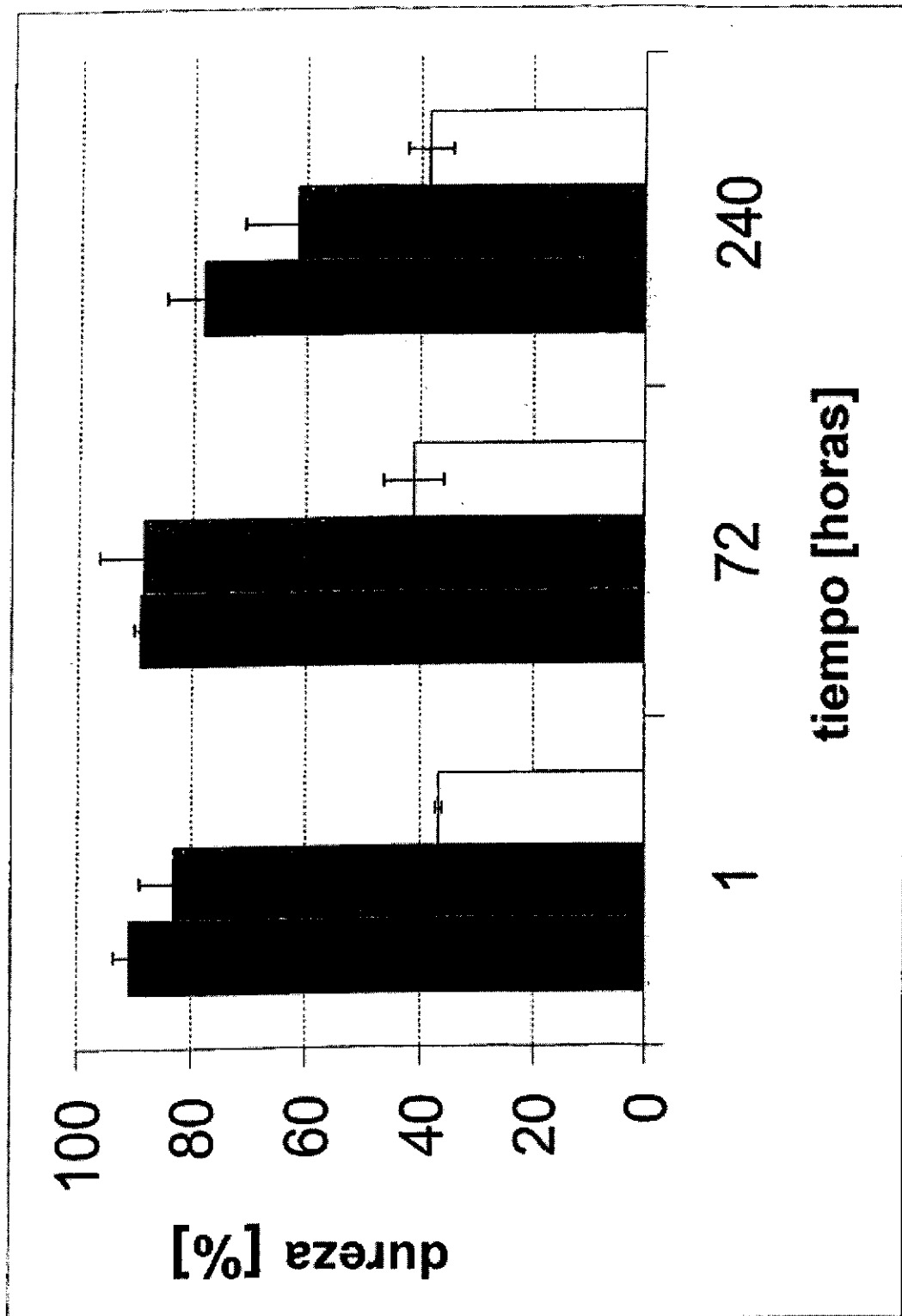


Fig. 4/18

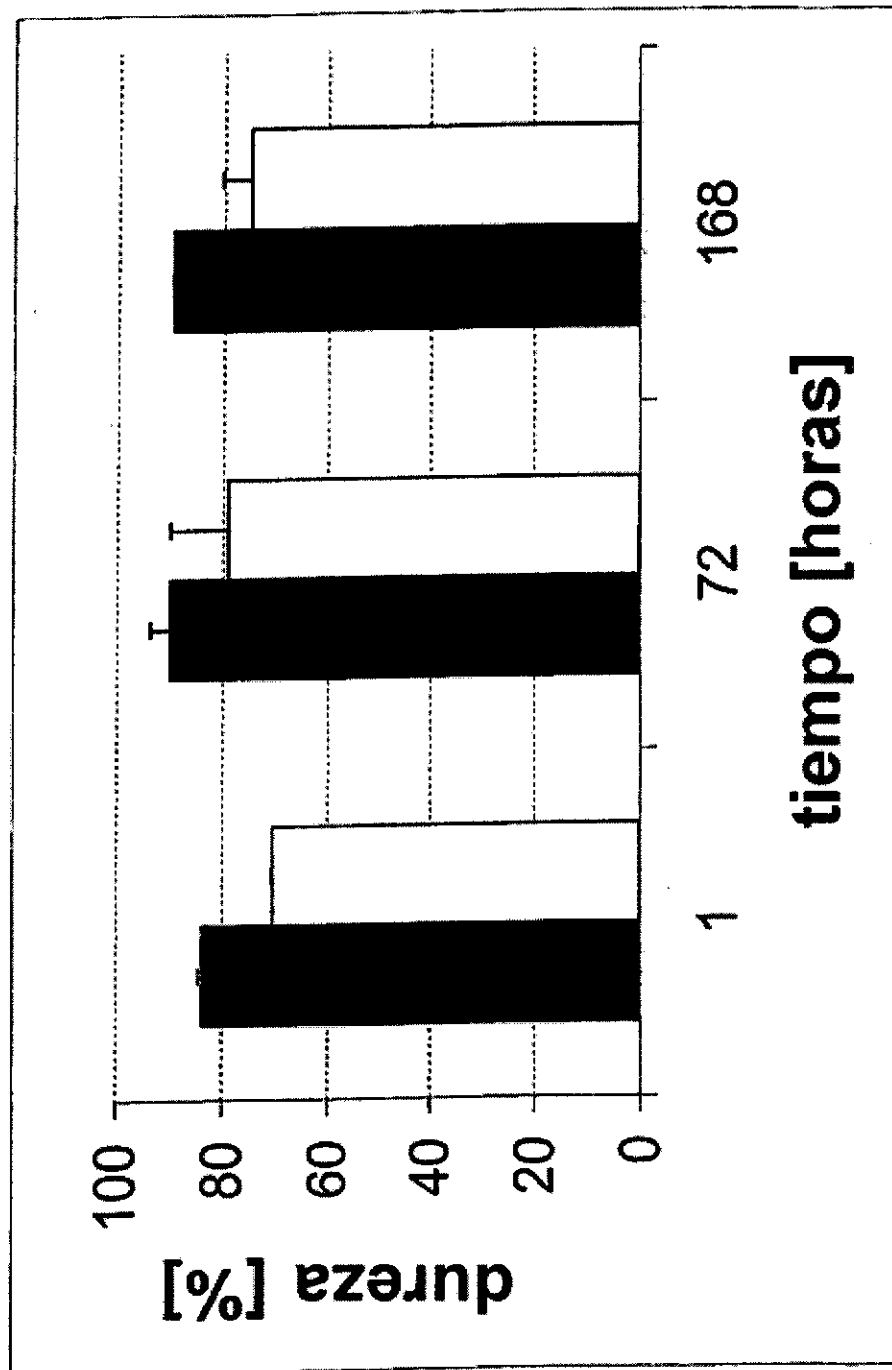


Fig. 5/18

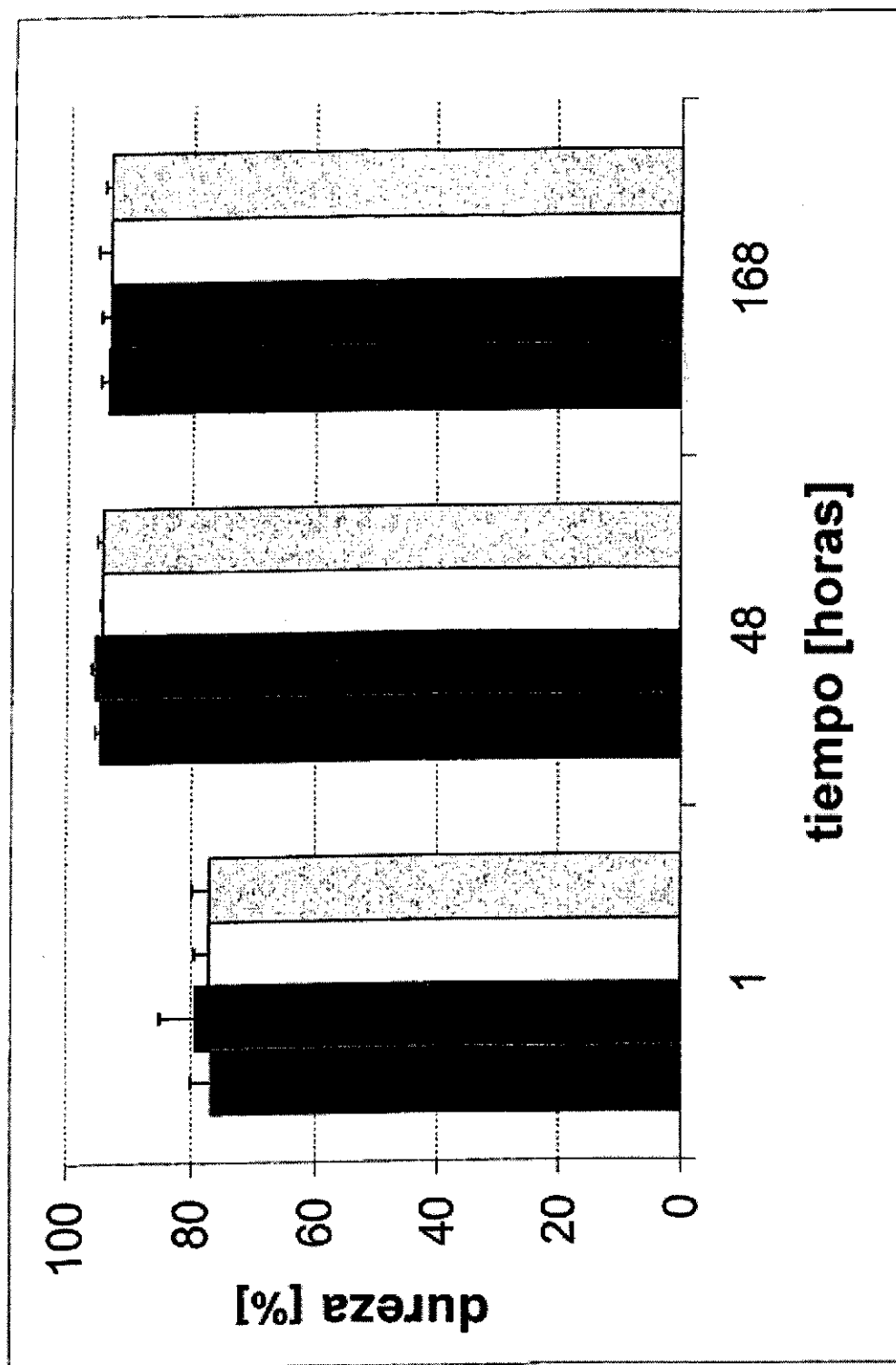


Fig. 6/18

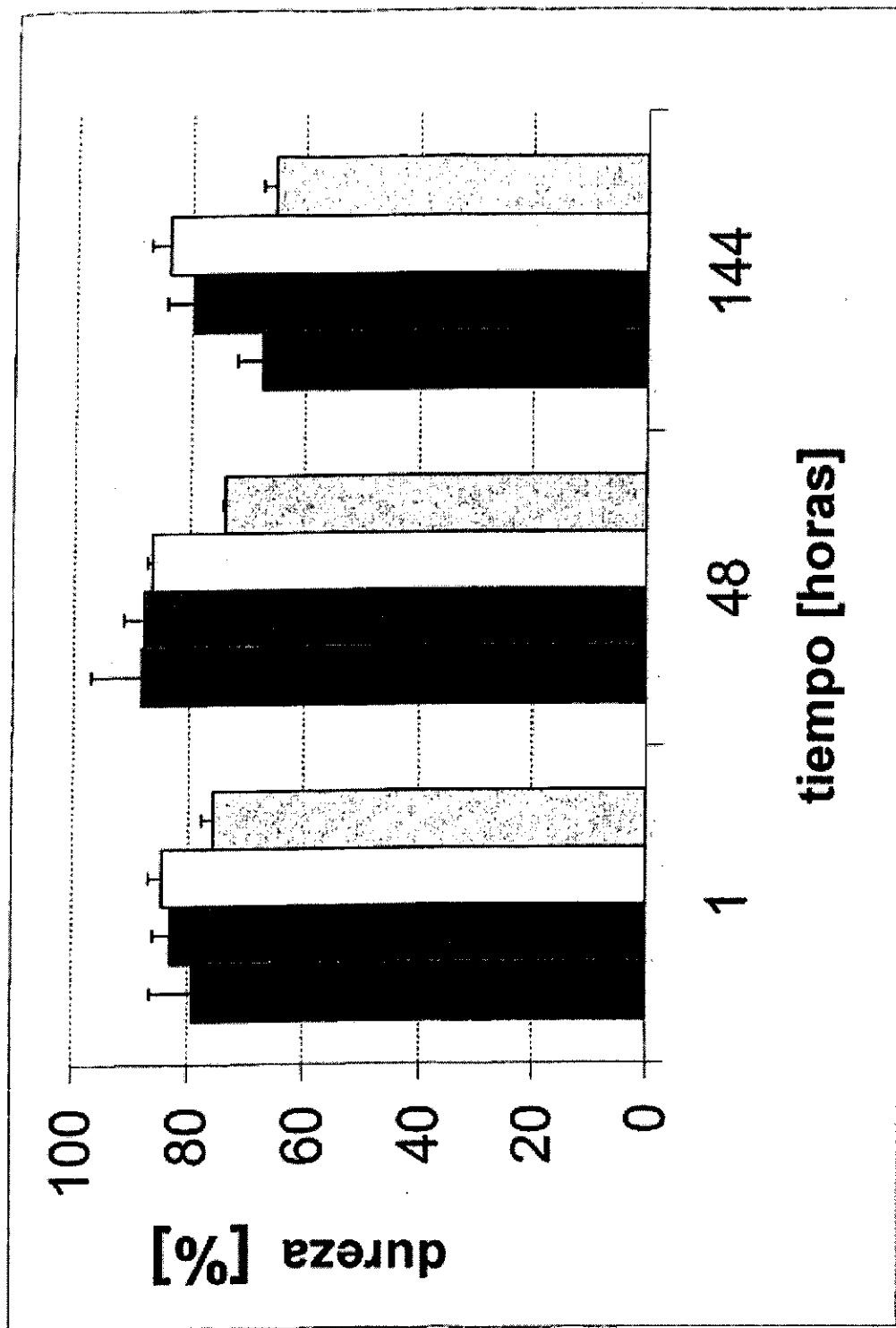


Fig. 7/18

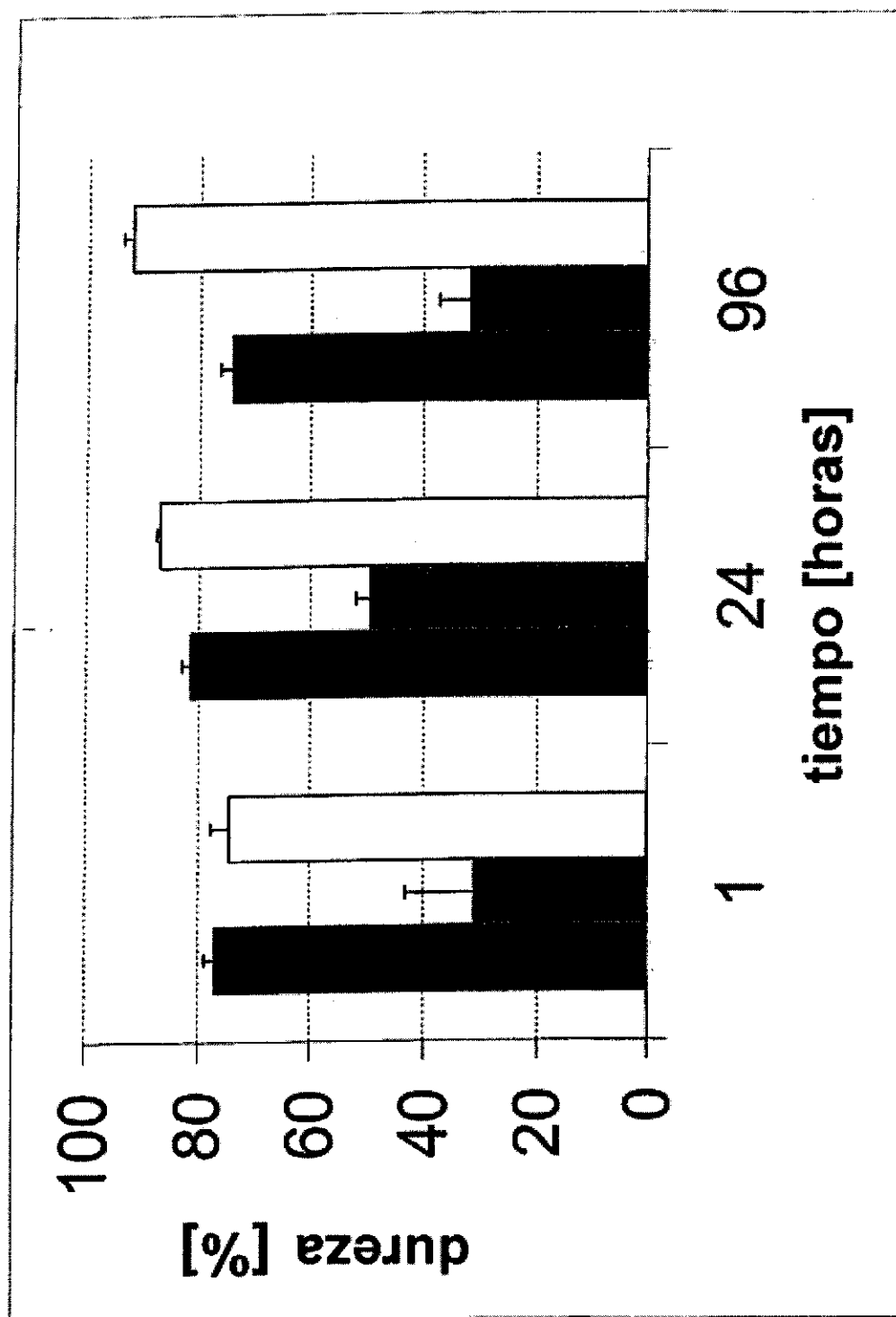


Fig. 8/18

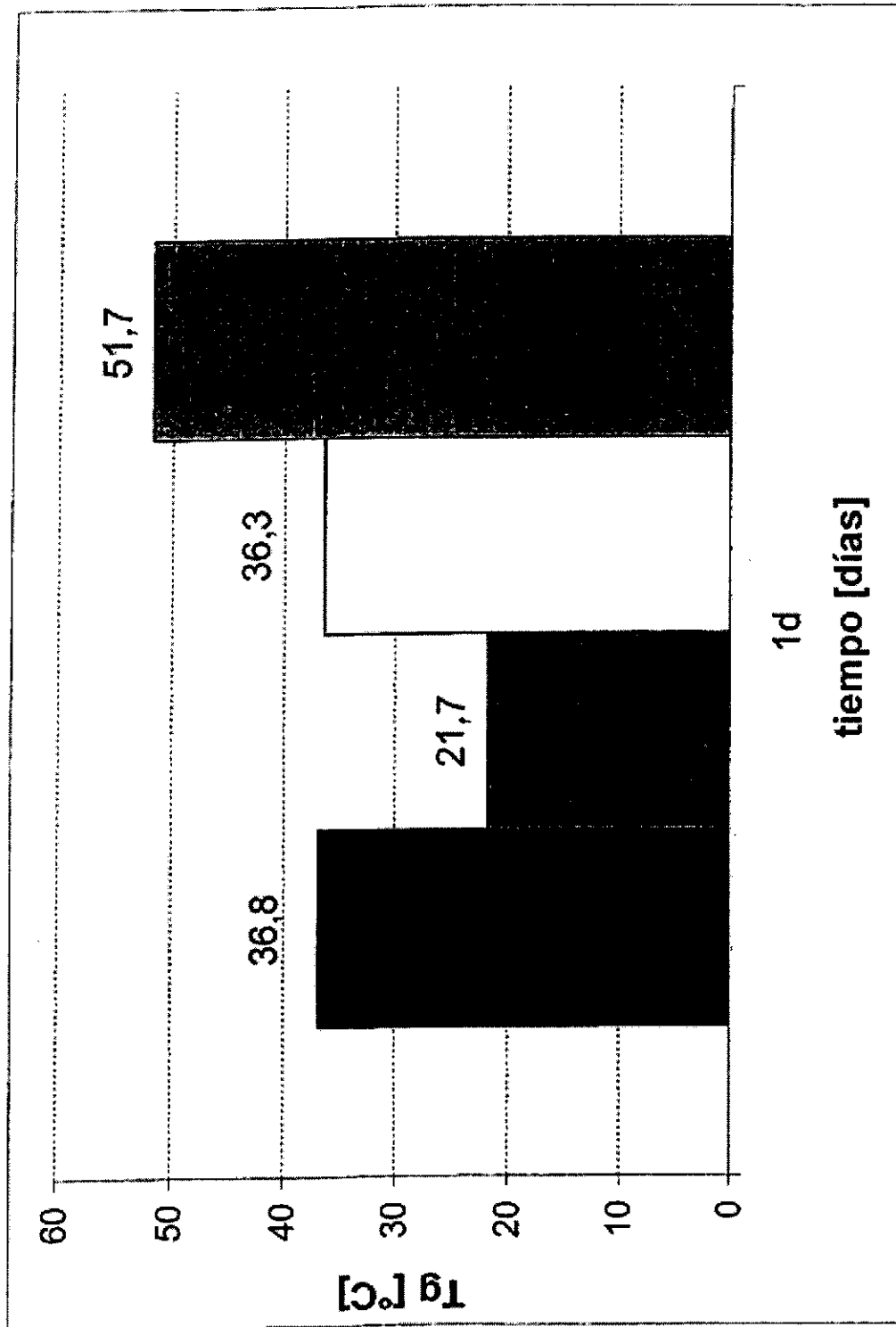


Fig. 9/18

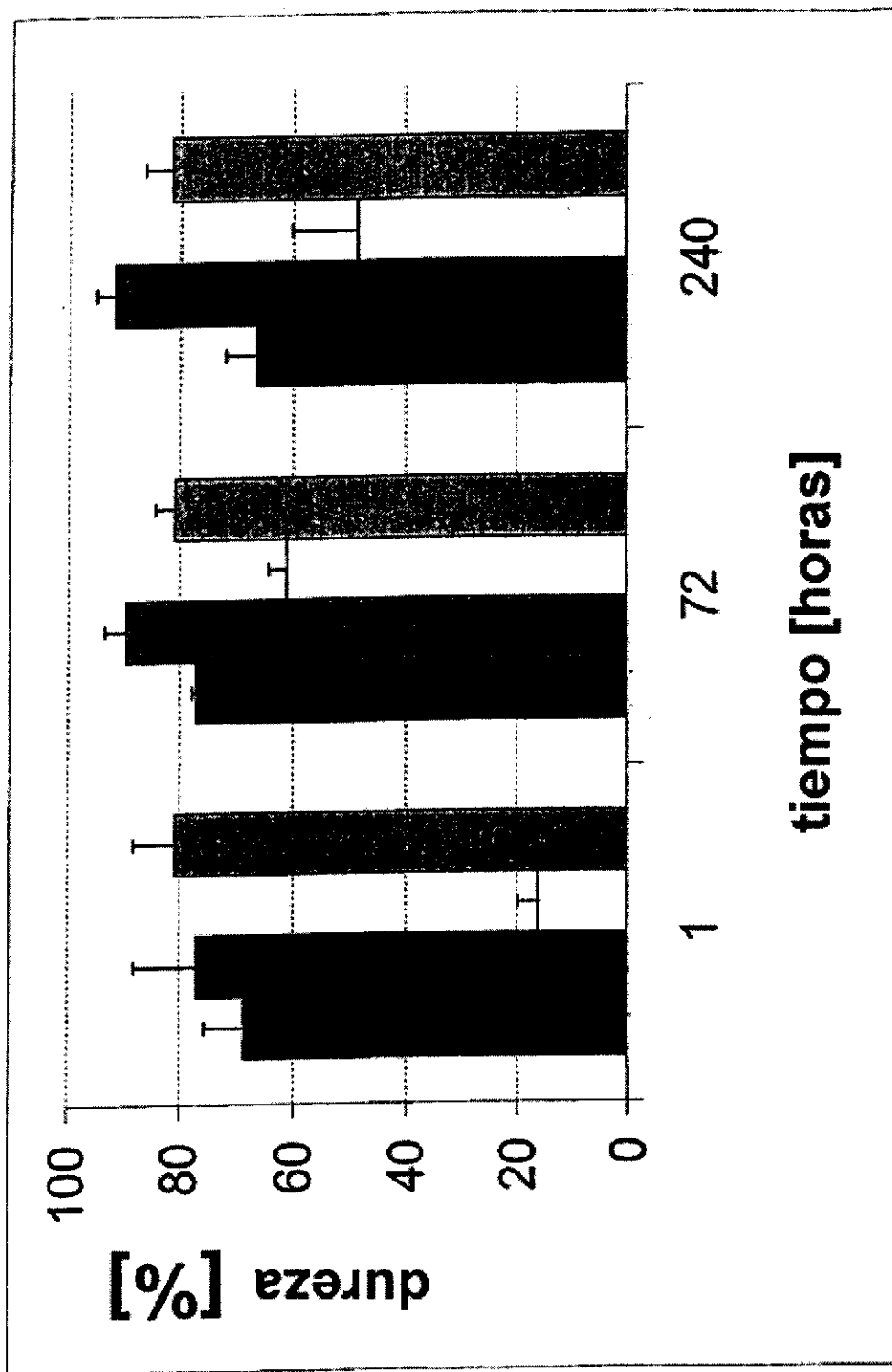


Fig. 10/18

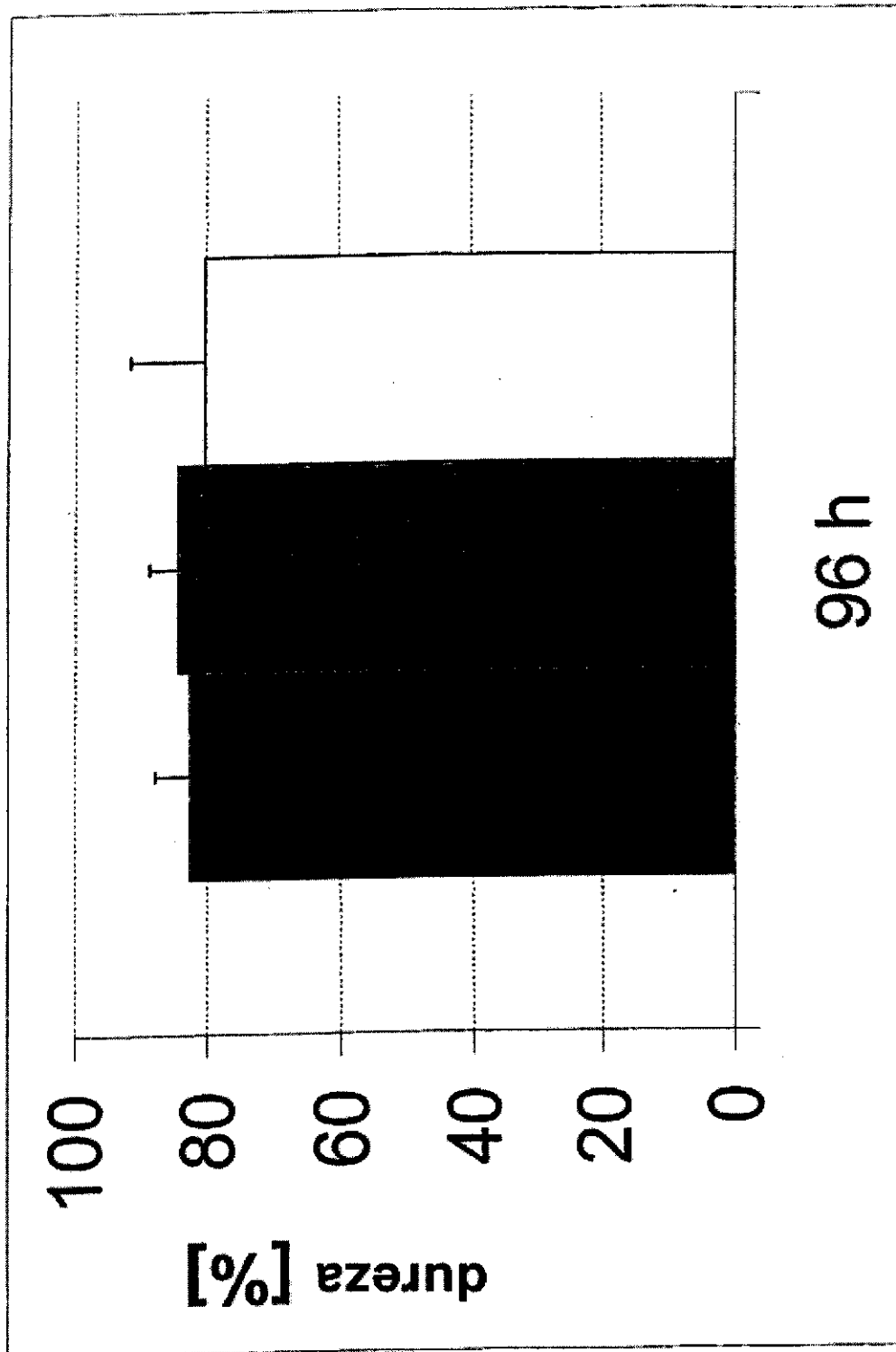


Fig. 11/18

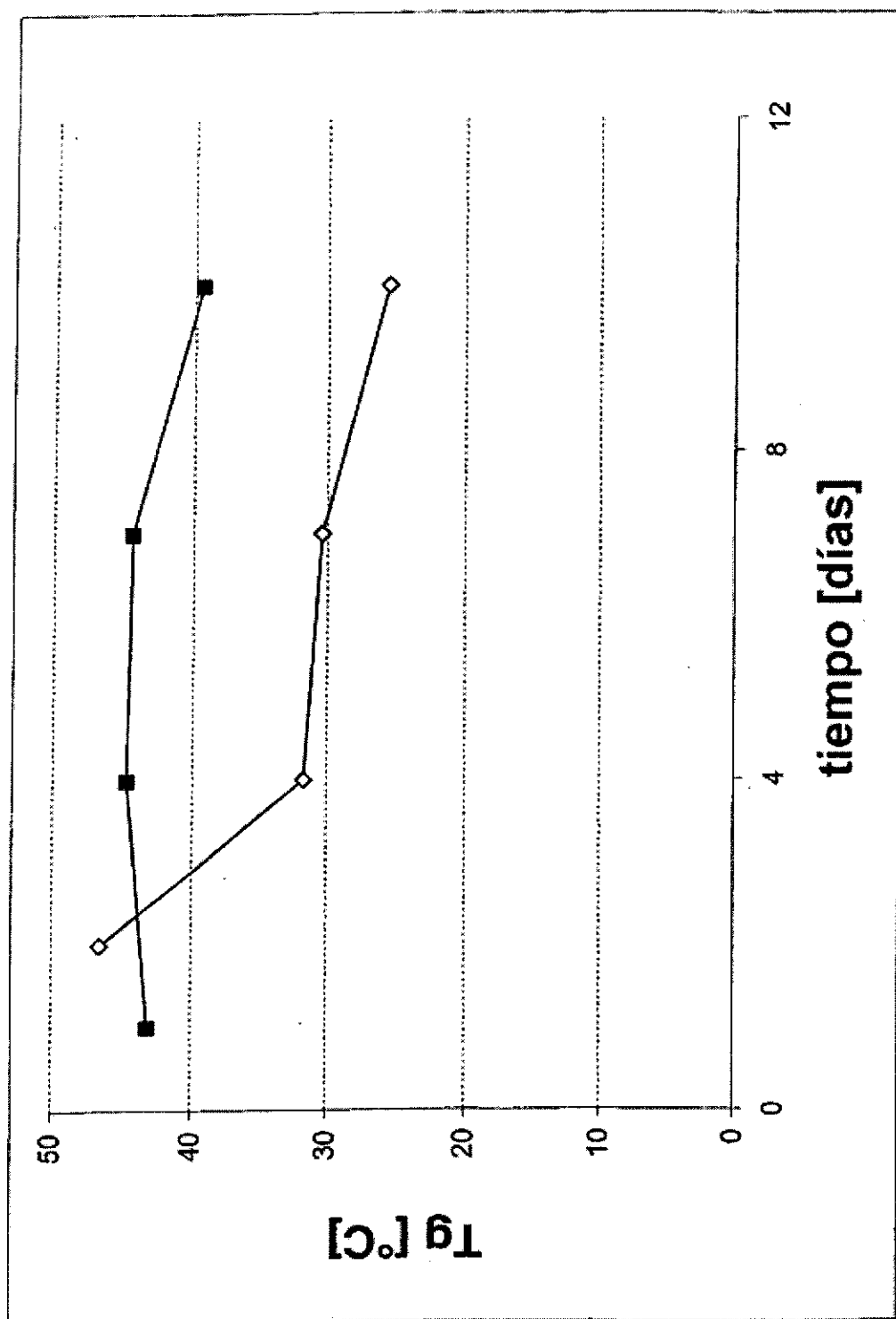


Fig. 12/18

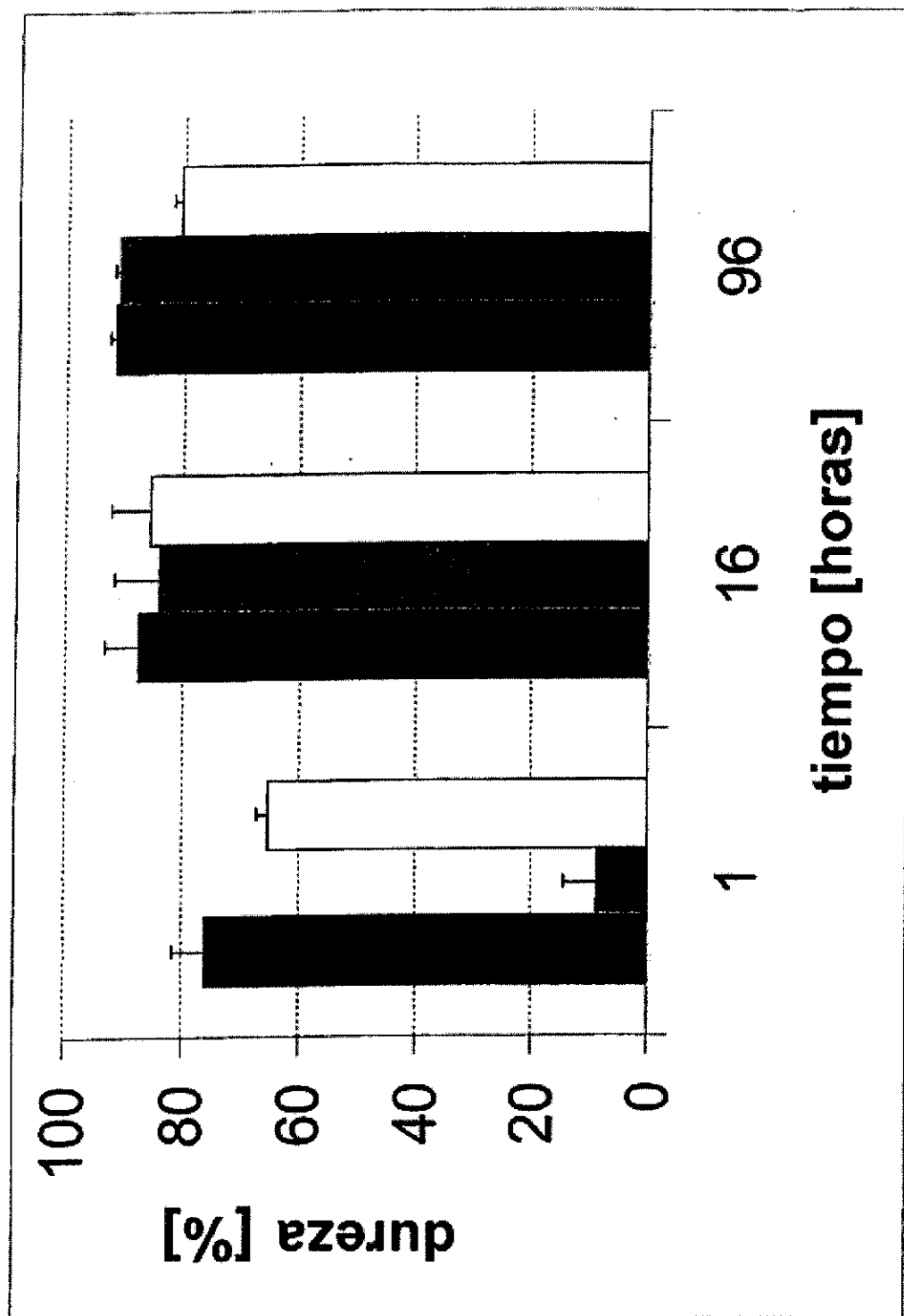


Fig. 13/18

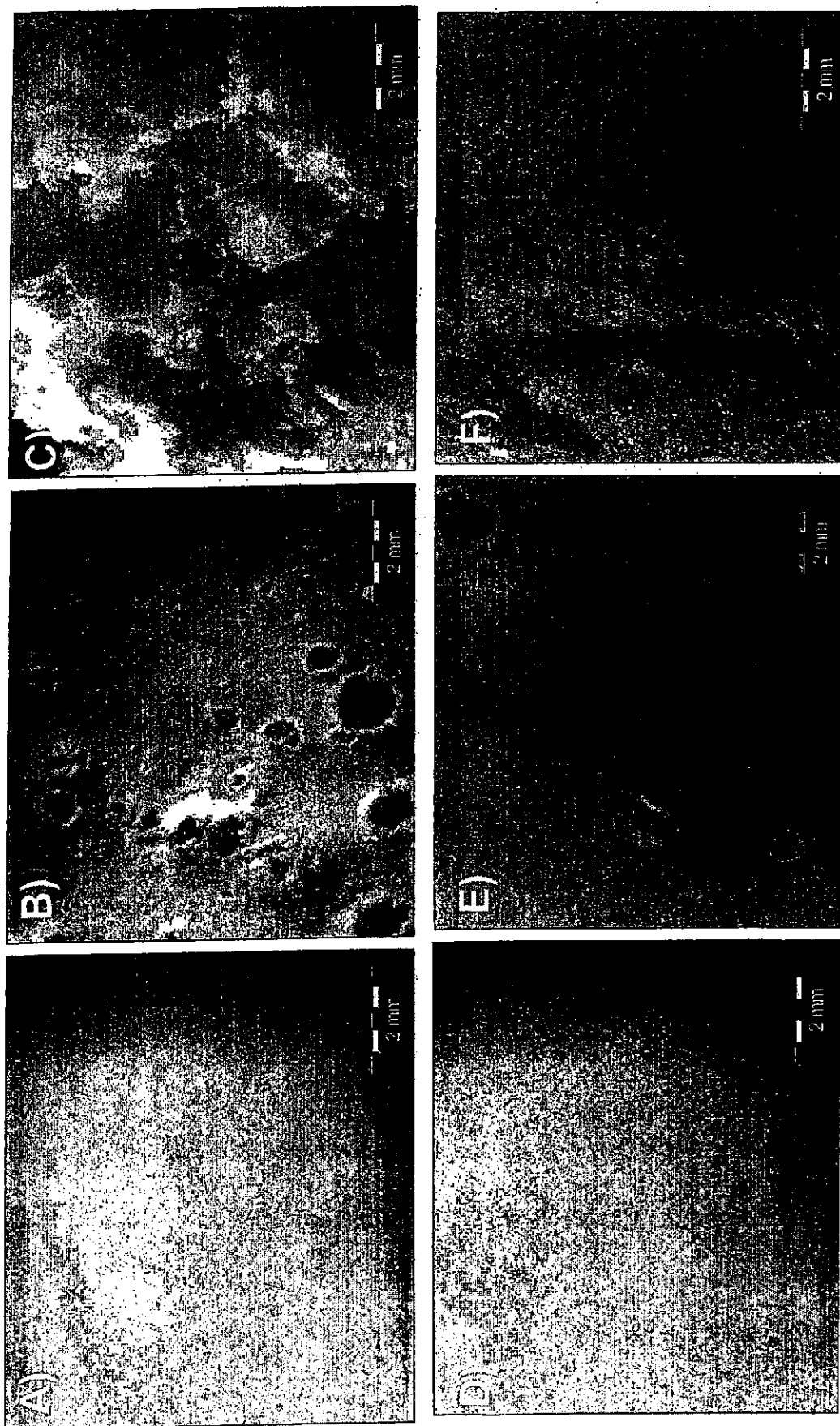


Fig. 14/18

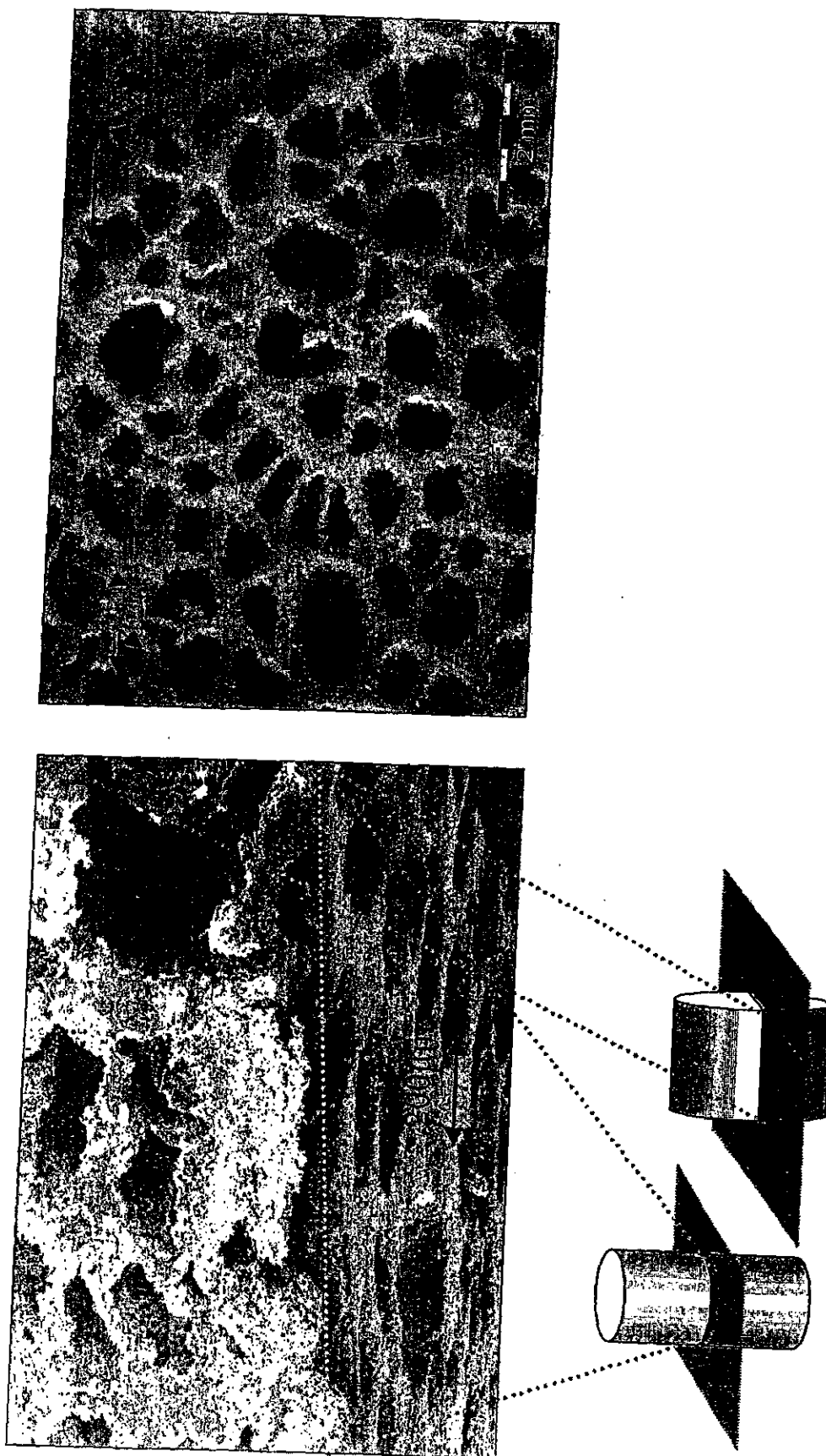


Fig. 15/18

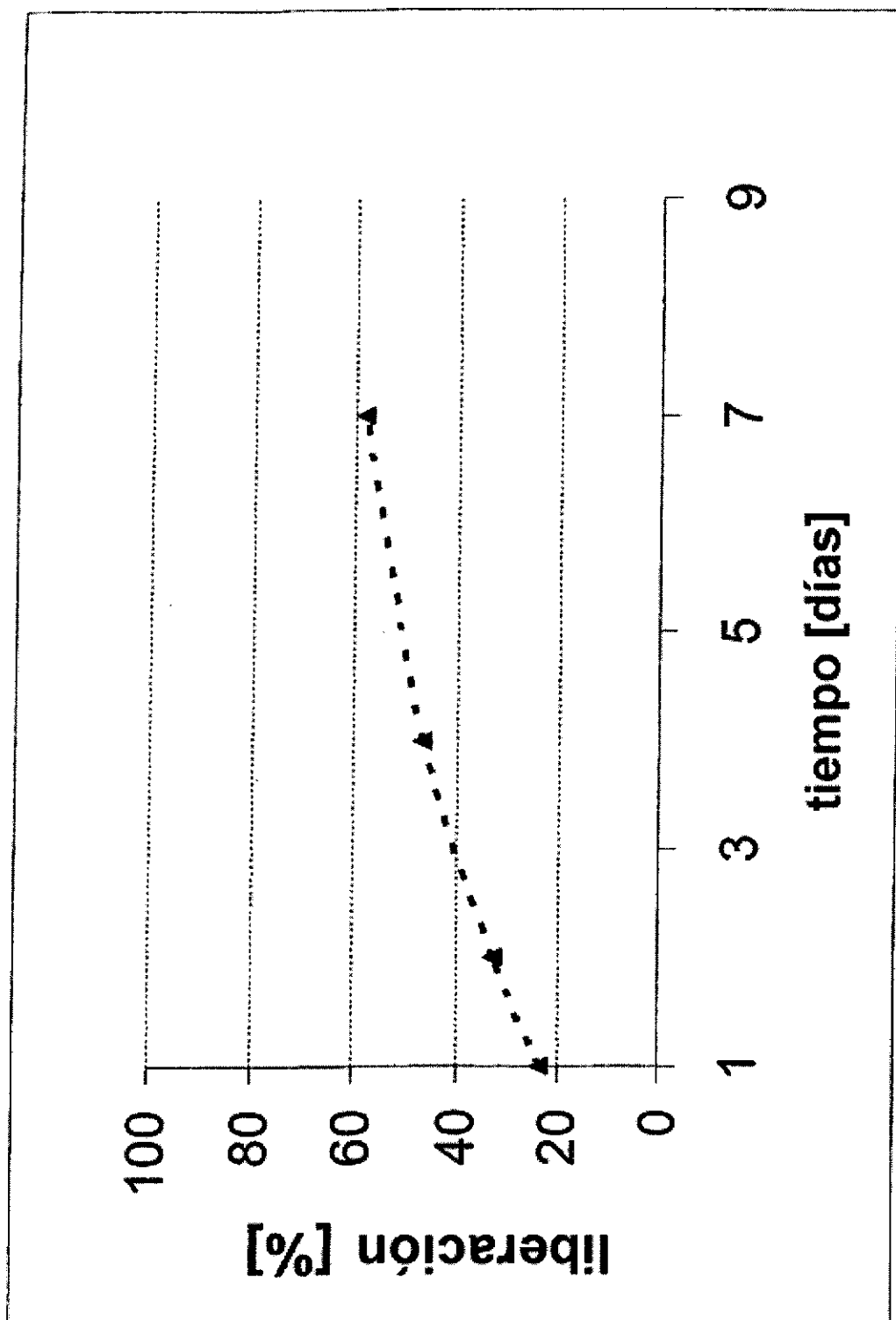


Fig. 16/18

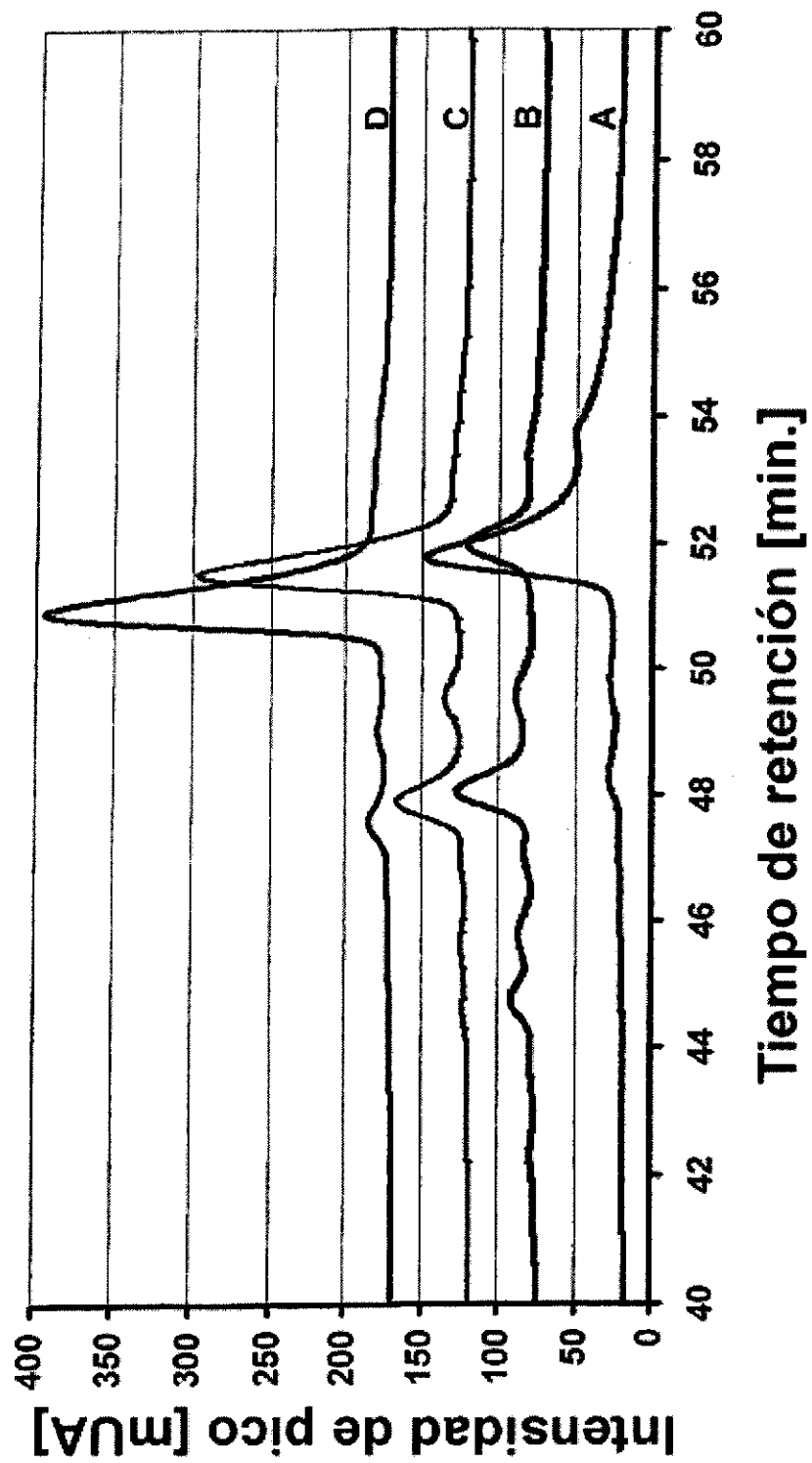


Fig. 17/18

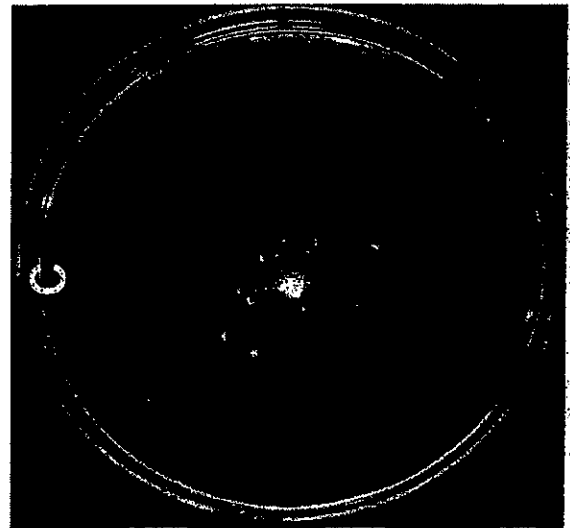
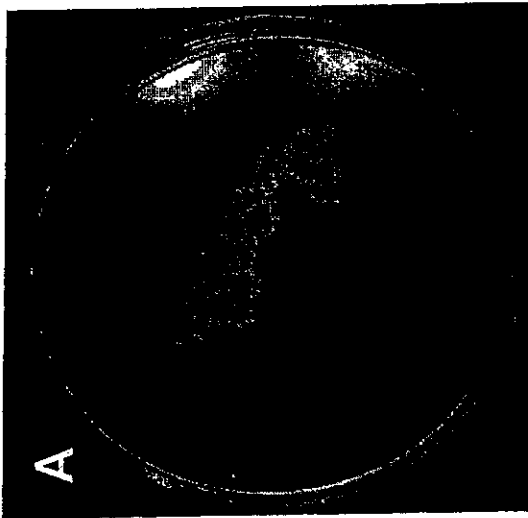


Fig. 18/18