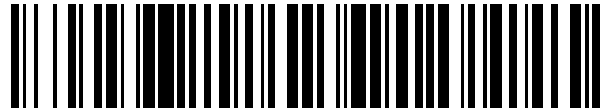


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 581**

51 Int. Cl.:

**A61L 24/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 11152734 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2311505**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de hueso**

30 Prioridad:

**09.02.2006 US 771826 P**

**30.06.2006 US 817988 P**

**17.11.2006 US 859809 P**

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

**19.02.2014**

73 Titular/es:

**BIOMIMETIC THERAPEUTICS, LLC (100.0%)**

**389 Nichol Mill Lane**

**Franklin TN 37067, US**

72 Inventor/es:

**HART, CHARLES E.;**

**HOLLINGER, JEFFREY O. y**

**LYNCH, SAMUEL E.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 443 581 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).

## Composiciones y métodos para el tratamiento de hueso

### Descripción

#### 5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones, métodos y kits para el tratamiento de hueso, especialmente hueso deteriorado o dañado.

#### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Los problemas musculoesqueléticos son generalizados en toda la población en todos los grupos de edad y en ambos sexos. La mitad de los estadounidenses necesitarán ser atendidos por fracturas en algún momento de su vida, según un artículo ampliamente publicado presentado en la reunión anual de 2003 de la Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos (AAOS). Según este informe, en los EE.UU. se gastan más de 10 mil millones de dólares anuales en atención hospitalaria asociada con el tratamiento de fracturas.

20 La salud ósea es una cuestión cada vez más importante ya que más de 25 millones de personas padecen osteoporosis y 7 millones más experimentan fracturas óseas cada año en los Estados Unidos. La osteoporosis y la mala salud ósea contribuyen significativamente al deterioro de la estructura ósea, que conduce a la generación de fracturas óseas con facilidad y a la reparación del hueso afectado. Según la Sociedad de Radiología Cardiovascular e Intervencionista, la osteoporosis provoca aproximadamente 700.000 fracturas vertebrales cada año.

25 Existen muchos factores que pueden contribuir a una mala salud ósea. Varios factores son el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo, la mala alimentación, la inactividad física y la predisposición genética. Por otra parte, el envejecimiento y la osteoporosis contribuyen a disminuir la masa ósea y la densidad mineral, así como la disminución de las tasas de consolidación de las fracturas óseas. Los posibles factores que contribuyen a la disminución de las tasas de consolidación del hueso en personas con osteoporosis incluyen una reducción de la maduración de las células progenitoras de osteoblastos, una reducción de la actividad proliferativa de las células osteoprogenitoras, una disminución de la capacidad de formación de hueso de los osteoblastos maduros, una disminución de la respuesta osteoblástica a la señalización química y un desequilibrio negativo entre la formación de hueso y la resorción ósea.

35 El hueso sano puede verse perjudicialmente afectado por el hueso debilitado o por mecanismos compensatorios que afectan a la carga en el hueso sano. Un paciente con una lesión en un lado del cuerpo, por ejemplo, una fractura de cadera o un fémur deteriorado debido a una necrosis avascular o una osteoartritis, puede favorecer el lado lesionado y añadir carga a la cadera o al fémur contralateral. Dentro de la columna vertebral, una vértebra dañada puede añadir tensión a las vértebras adyacentes por encima o por debajo de ella, dañando con el tiempo estas vértebras. Resulta necesario un método para reforzar estos huesos sanos que son sometidos a un esfuerzo adicional y a daños potenciales a fin de prevenir o mitigar tales daños.

40 Las fracturas vertebrales por compresión (FVC) son las fracturas osteoporóticas más comunes, produciéndose en aproximadamente el 20% de las mujeres posmenopáusicas (Eastell *et al.*, J Bone Miner Res 1991; 6:207-215). Se estima que se producen anualmente 700.000 FVC, y sólo 250.000 de ellas son diagnosticadas y tratadas. Debido a que estas fracturas quedan sin tratar, la osteoporosis puede quedar sin tratar y avanzar rápidamente. Las mujeres posmenopáusicas tienen un riesgo 5 veces mayor de sufrir otra fractura vertebral en el siguiente año y un riesgo 2 veces mayor de otras fracturas por fragilidad ósea, incluidas las fracturas de cadera (Klotzbuecher *et al.*, J Bone Miner Res, 2000, 15:721-739).

50 Las FVC se producen cuando hay una rotura en una o ambas placas terminales del cuerpo vertebral, normalmente debido a un traumatismo, lo que debilita las vértebras y hace que la columna anterior falle como soporte del cuerpo durante las actividades de la vida diaria. Las fracturas vertebrales por compresión debidas a la osteoporosis pueden provocar dolor de espalda debilitante, deformidad de la columna y pérdida de altura. Las fracturas vertebrales sintomáticas y asintomáticas se asocian con una mayor morbilidad y mortalidad. Se espera un drástico aumento del número de personas mayores en situación de riesgo por osteoporosis en las próximas décadas, que hace necesaria la identificación precisa de las FVC y la intervención terapéutica para reducir el enorme impacto potencial de esta enfermedad en los pacientes y en los sistemas sanitarios.

60 Tradicionalmente, las FVC debidas a la osteoporosis se han tratado con reposo en cama, analgésicos narcóticos, aparatos ortopédicos y terapia física. Sin embargo, el reposo en cama conduce a la pérdida acelerada de hueso y al desacondicionamiento físico, lo que agrava aún más el estado del paciente y contribuye al problema de la osteoporosis. Por otra parte, el uso de narcóticos puede empeorar el estado de ánimo y los problemas mentales que pueden ser ya frecuentes en las personas de edad avanzada. Además, las personas de edad avanzada no toleran bien llevar aparatos ortopédicos. Aunque los actuales tratamientos de la osteoporosis tales como el reemplazo hormonal, los bifosfonatos, la calcitonina y análogos de la hormona paratiroidea (PTH) hacen frente a problemas a

65

largo plazo, a excepción de la calcitonina, no proporcionan ningún beneficio inmediato en términos de control del dolor una vez producida una fractura (Kapuscinski *et al.*, Master Med. Pol. 1996; 28:83-86).

5 Recientemente, se han desarrollado tratamientos mínimamente invasivos para las fracturas por compresión del cuerpo vertebral, la vertebroplastia y la cifoplastia, para hacer frente a los problemas del dolor y estabilizar la fractura. La vertebroplastia es el llenado de un cuerpo vertebral fracturado que tiene como objetivo estabilizar el hueso, evitar un mayor colapso y eliminar el dolor agudo debido a la fractura. Sin embargo, la vertebroplastia no trata de restaurar la altura vertebral y/o la alineación sagital. Además, dado que no hay hueco en el hueso, el relleno vertebral se realiza con un menor control con menos cemento viscoso y, como consecuencia, resultan comunes las fugas del material de relleno.

10 La cifoplastia es un procedimiento quirúrgico mínimamente invasivo que tiene como objetivo la seguridad, mejorando la altura vertebral y estabilizando la FVC. Un balón inflable para cementación, guiado mediante imágenes de rayos X, se infla en el cuerpo vertebral fracturado. Esto compacta el hueso esponjoso interno, ya que empuja las cortezas fracturadas de vuelta hacia su posición normal. A continuación puede realizarse la fijación rellenando el hueco con un biomaterial con control de volumen con un cemento más viscoso. Aunque la cifoplastia se considera un tratamiento seguro y eficaz de las fracturas vertebrales por compresión, los estudios biomecánicos demuestran que la cementación ejerce tensión adicional en los niveles adyacentes. De hecho, este aumento de la rigidez puede disminuir la carga de rotura final de las vértebras adyacentes en un 8% a un 30% y provocar posteriores fracturas (Berlemann *et al.*, J Bone Joint Surgery BR, 2002; 84:748-52). La fractura por compresión de uno o más cuerpos vertebrales con posterioridad a la vertebroplastia o a la cifoplastia se denomina en el presente documento "fractura vertebral secundaria por compresión".

15 En un estudio clínico reciente, se observó una mayor tasa de fractura vertebral secundaria por compresión después de la cifoplastia en comparación con los datos históricos para las fracturas no tratadas. La mayoría de ellas se produjeron en un nivel adyacente dentro de los 2 meses siguientes a la intervención inicial. Después de este período de dos meses, hubo fracturas vertebrales secundarias por compresión sólo ocasionales que se produjeron en niveles alejados. Este estudio confirmó los estudios biomecánicos que demostraban que la cementación ejerce presión adicional en el nivel adyacente. (Fribourg *et al.*, Incidence of subsequent vertebral fracture after kyphoplasty, Spine, 2004, 20, 2270-76).

20 Teniendo en cuenta el aumento de la incidencia del uso de técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas para el tratamiento de las fracturas vertebrales por compresión y la predisposición de las vértebras adyacentes a experimentar fracturas secundarias por compresión, existe una necesidad clínica no satisfecha para el tratamiento profiláctico y la prevención de las FVC secundarias.

25 Las fracturas del radio distal son un importante problema de salud pública y la principal fuente de morbilidad en las personas de edad avanzada. Se estima que cada año se producen 1,4 millones de fracturas de muñeca, antebrazo y mano, y de éstas, casi la mitad (44%) son fracturas de cúbito y radio. En los Estados Unidos, el 17% de todas las visitas a urgencias se deben a lesiones de muñeca [Hanel *et al.*, Orthop. Clin. North Am. Enero 33(1): 35-57, 2002]. Las fracturas del radio distal suponen una sexta parte de todas las fracturas observadas en el servicio de urgencias (McMurtry *et al.*, Fractures of the Distal Radius, 1992). Casi una de cada cuatro mujeres habrá sufrido una fractura del radio distal a los 90 años, lo que da como resultado aproximadamente 200.000 fracturas al año en los Estados Unidos con un costo directo estimado de casi 150 millones de dólares (Phillips *et al.*, Bone 1988, 9:271-9, 1986). Además, debido a que se producen con mayor frecuencia en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, estas mujeres tienen una densidad ósea disminuida, lo que hace sus fracturas especialmente problemáticas de tratar y susceptibles de volver a producirse.

30 En la actualidad, no existe un consenso sobre el tratamiento de elección de las fracturas del radio distal. Por lo general, las fracturas estables reciben reducción cerrada e inmovilización con una escayola. Sin embargo, las fracturas del radio distal inestables pueden tratarse con clavos percutáneos incorporados en una escayola, fijación esquelética externa de metal con o sin clavos y/o injerto óseo, reducción abierta limitada con o sin injerto óseo, o reducción abierta amplia y fijación interna con o sin clavos y/o injerto óseo.

35 Informes recientes han demostrado la capacidad de las placas volares de ángulo fijo para proporcionar una fijación interna más estable para los procedimientos quirúrgicos que requieren reducción abierta y fijación interna (RAFI), y disminuir la morbilidad posterior en el tratamiento de fracturas inestables del radio distal en comparación con otra técnicas de fijación interna (Orbay *et al.*, J. Hand. Surg. 29A, 96-102, 2004).

40 La evaluación quirúrgica para determinar un plan de tratamiento en base a las diversas morfologías de fractura puede ser complejo. A menudo se utilizan clasificaciones de fracturas basadas en el tratamiento para determinar el tratamiento óptimo e intentar predecir un resultado en base al patrón de fractura. Un sistema de clasificación de utilidad clínica debe ayudar al cirujano a evaluar y describir el patrón de fractura, ayudar a seleccionar una modalidad terapéutica para el tratamiento de la fractura, y pronosticar el resultado clínico. El sistema AO universalmente aceptado es una clasificación detallada de las fracturas organizada por orden de gravedad creciente para las implicaciones extra e intraarticulares óseas. Las fracturas de tipo A son fracturas extraarticulares que no

invaden la(s) superficie(s) de la articulación; el tipo B describe fracturas articulares limitadas; y el tipo C implica fracturas articulares complejas. Cada tipo se divide a su vez en tres subgrupos basados en la complejidad morfológica, la dificultad del tratamiento y el pronóstico clínico.

5 En algunos casos, las fracturas del radio distal requieren injerto óseo para asegurar la adecuada consolidación del hueso. Una de las opciones más ampliamente utilizadas para el injerto óseo es el hueso autólogo. Sin embargo, ha habido problemas asociados con el autoinjerto, incluidas las desventajas asociadas con los injertos de hueso autólogo. La mayoría de estos problemas son el resultado de la recolección del injerto óseo, incluido un mayor tiempo de operación, estancia hospitalaria, costos, aumento de la pérdida de sangre, dolor postoperatorio, riesgo de infección y/o fractura. Otras complicaciones asociadas con el autoinjerto incluyen un potencial foco de infecciones asociadas con el hueso avascular, el suministro limitado a los tejidos y la variabilidad de la actividad celular del injerto óseo (Younger *et al.*, J. Orthop. Trauma, 3, 192-195, 1989). La morbilidad asociada con el autoinjerto demuestra la necesidad de una mejor alternativa para un sustituto de injerto óseo angiogénico, mitogénico y quimiotáctico como alternativa para la cementación de fracturas.

10 En vista de los significativos problemas de salud planteados por la mala salud ósea y las enfermedades óseas, tales como la osteoporosis, sería deseable proporcionar composiciones capaces de facilitar los procesos de consolidación de fracturas óseas y promover actividades de remodelado de hueso sano. Además, sería deseable proporcionar métodos de tratamiento de hueso fracturado o deteriorado de otro modo con composiciones capaces de promover los procesos de remodelado de hueso sano y consolidación de las fracturas. En vista de las dificultades asociadas con los injertos de hueso autólogo, sería deseable proporcionar sistemas alternativos de regeneración osteogénica. Además, sería deseable proporcionar sistemas alternativos de regeneración osteogénica en los tratamientos de fracturas óseas, incluidas las fracturas de huesos tales como el radio distal y las estructuras anatómicas asociadas de la muñeca.

25 RESUMEN

30 La presente descripción proporciona métodos y composiciones de la invención para el tratamiento de hueso, incluido hueso deteriorado tal como hueso fracturado, hueso enfermo, hueso debilitado y hueso susceptible de ser sometido a un aumento de carga, tal como un aumento de la carga compensatoria. Estas composiciones y métodos facilitan la formación de hueso y refuerzan el hueso. La presente descripción prevé el uso de las composiciones para el tratamiento de hueso y el uso de las composiciones en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de hueso.

35 Más concretamente, la presente invención proporciona una composición según se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o el tratamiento profiláctico de un hueso con baja densidad ósea, en la que la composición facilita la formación de hueso.

40 Las composiciones de la presente descripción se utilizan para facilitar el refuerzo y la curación del hueso, incluido hueso fracturado. Un hueso a ser tratado con las composiciones de la presente invención puede ser el húmero, cúbito, radio, fémur, tibia, peroné, rótula, huesos del tobillo, huesos de la muñeca, carpianos, metacarpianos, falanges, tarsos, metatarsos, costillas, esternón, vértebras, escápula, clavícula, pelvis o sacro. En las formas de realización específicas, el radio, el fémur, la tibia y una o más vértebras se tratan con las composiciones y métodos de la presente invención.

45 En un aspecto, una composición proporcionada por la presente invención para el tratamiento de hueso comprende una solución que comprende el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y una matriz biocompatible, en la que la solución está dispuesta en la matriz biocompatible. El PDGF está presente en la solución a una concentración que va desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 1,0 mg/ml. La concentración de PDGF dentro de la solución puede estar dentro del intervalo de concentración indicado anteriormente.

50 En las formas de realización de la presente invención, el PDGF comprende homodímeros y heterodímeros de PDGF, incluidos PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD, y mezclas y derivados de los mismos. En una forma de realización, el PDGF comprende PDGF-BB. En otra forma de realización, el PDGF comprende un PDGF humano recombinante (rh) tal como PDGF-BB humano recombinante (rhPDGF-BB).

55 En las formas de realización de la presente invención, el PDGF comprende fragmentos de PDGF. En una forma de realización, el rhPDGF-B comprende los siguientes fragmentos: secuencias de aminoácidos 1-31, 1-32, 33-108, 33-109 y/o 1-108 de la totalidad de la cadena B. La secuencia de aminoácidos completa (1-109) de la cadena B de PDGF se proporciona en la Figura 15 de la patente de EE.UU. Nº 5.516.896. Debe entenderse que las composiciones de rhPDGF de la presente invención pueden comprender una combinación de rhPDGF-B intacto (1-109) y fragmentos del mismo. Pueden emplearse otros fragmentos de PDGF tales como los descritos en la patente de EE.UU. Nº 5.516.896. Según una forma de realización preferente, el rhPDGF-BB comprende al menos un 65% de rhPDGF-B intacto (1-109).

65

Una matriz biocompatible, según la presente invención, comprende un material de armazón óseo. En algunas realizaciones, el material de armazón óseo comprende fosfato cálcico. El fosfato cálcico, en una forma de realización, comprende  $\beta$ -fosfato tricálcico.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición tal como se define en la reivindicación 1 para el tratamiento de hueso que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible, en la que la matriz biocompatible consiste en un material de armazón óseo y un aglutinante biocompatible. La solución de PDGF puede tener una concentración de PDGF como se ha descrito anteriormente. El material de armazón óseo en algunas realizaciones, consiste de fosfato cálcico. En una forma de realización, un fosfato cálcico comprende un
- 10  $\beta$ -fosfato tricálcico. En un aspecto, las matrices biocompatibles pueden incluir partículas de fosfato cálcico con o sin aglutinantes biocompatibles o aloinjerto óseo, tal como aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado (DFDBA) o matriz ósea desmineralizada particulada (DBM). En otro aspecto, las matrices biocompatibles pueden incluir aloinjerto óseo, tal como DFDBA o DBM.
- 15 Por otra parte, un aglutinante biocompatible, según algunas formas de realización de la presente invención, comprende proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, polímeros sintéticos, o mezclas de los mismos. En una forma de realización, un aglutinante biocompatible comprende colágeno. En otra forma de realización, un aglutinante biocompatible comprende colágeno, tal como colágeno bovino o humano.
- 20 La presente descripción proporciona adicionalmente métodos para producir composiciones para el tratamiento de hueso, así como métodos para el tratamiento de hueso. En una forma de realización, un método para producir una composición comprende proporcionar una solución que comprende PDGF, proporcionar una matriz biocompatible y disponer la solución en la matriz biocompatible.
- 25 En otra forma de realización, un método para tratar hueso deteriorado comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y aplicar la composición al hueso deteriorado. En una forma de realización adicional, un método para tratar hueso deteriorado comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible, disponer la composición en una jeringa e inyectar la composición en un sitio de hueso deteriorado.
- 30 La presente descripción proporciona adicionalmente métodos para producir composiciones para su uso en el tratamiento de fracturas. En una forma de realización, un método para producir una composición comprende proporcionar una solución que comprende PDGF, proporcionar una matriz biocompatible y disponer la solución en la matriz biocompatible.
- 35 En otra forma de realización, un método para tratar una fractura comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y aplicar la composición a la fractura. En algunas formas de realización, aplicar la composición comprende inyectar la composición en la fractura. En una forma de realización, la inyección comprende la inyección percutánea de la composición en el sitio de fractura. En otra forma de realización, la composición se inyecta en una fractura abierta o expuesta quirúrgicamente. En una forma de realización adicional, aplicar la composición comprende disponer la composición en la fractura con una espátula u otro dispositivo.
- 40 En algunas formas de realización, un método para tratar una fractura comprende adicionalmente reducir la fractura y/o estabilizar la fractura. Reducir la fractura, según algunas formas de realización, comprende la reducción abierta. En otras formas de realización, reducir la fractura comprende la reducción cerrada. Por otra parte, estabilizar una fractura, en algunas formas de realización, comprende aplicar a la fractura un dispositivo de fijación externo o interno.
- 50 En otra forma de realización, un método para tratar una fractura comprende acelerar el nuevo relleno óseo en la fractura, en la que la aceleración comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y aplicar la composición a la fractura.
- 55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit que comprende una solución que comprende PDGF en un primer recipiente y un segundo recipiente que comprende una matriz biocompatible. En algunas formas de realización, la solución comprende una concentración predeterminada de PDGF. La concentración de PDGF puede determinarse según la naturaleza o la clasificación de la fractura que se está tratando. El kit puede comprender adicionalmente un material de armazón óseo y el material de armazón óseo puede comprender adicionalmente un aglutinante biocompatible. Por otra parte, la cantidad de matriz biocompatible proporcionado por un kit puede estar en función de la naturaleza o de la clasificación del hueso que se está tratando. La matriz biocompatible que puede
- 60 incluirse en el kit puede ser un material de armazón óseo, un material de armazón óseo y un aglutinante biocompatible, y/o aloinjerto óseo tal como aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado (DFDBA) o matriz ósea desmineralizada particulada (DBM). En una forma de realización el material de armazón óseo comprende un fosfato cálcico, tal como  $\beta$ -TCP. Una jeringa puede facilitar la disposición de la solución de PDGF en la matriz biocompatible para su aplicación a un sitio quirúrgico, tal como un sitio de fractura en el hueso. El kit también puede contener instrucciones de uso.
- 65

5 En otro aspecto, la presente invención también proporciona una composición para el tratamiento de hueso que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible, en la que la matriz biocompatible comprende un material de armazón óseo y un aglutinante biocompatible. La solución de PDGF puede tener una concentración de PDGF según se ha descrito anteriormente. Un material de armazón óseo, en algunas formas de realización, comprende fosfato cálcico. En una forma de realización, un fosfato cálcico comprende un  $\beta$ -fosfato tricálcico. En un aspecto, las matrices biocompatibles pueden incluir partículas de fosfato cálcico con o sin aglutinantes biocompatibles o aloinjerto óseo tal como el aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado (DFDBA) o matriz ósea desmineralizada particulada (DBM). En otro aspecto, las matrices biocompatibles pueden incluir aloinjerto óseo tal como DFDBA o DBM.

10 En algunas formas de realización de la presente invención, las composiciones para promover la formación de hueso en los cuerpos vertebrales y las composiciones para prevenir o reducir la probabilidad de fracturas vertebrales por compresión comprenden adicionalmente al menos un agente de contraste. Los agentes de contraste, según formas de realización de la presente invención, son sustancias capaces de proporcionar al menos parcialmente la diferenciación de dos o más tejidos corporales cuando se obtienen imágenes de los mismos. Los agentes de contraste, según algunas formas de realización, comprenden agentes de contraste catiónicos, agentes de contraste aniónicos, agentes de contraste no iónicos, o mezclas de los mismos. En algunas formas de realización, los agentes de contraste comprenden agentes de contraste radiopacos. Los agentes de contraste radiopacos, en algunas formas de realización, comprenden compuestos que incluyen yodo (S)-N,N'-bis[2-hidroxi-1-(hidroximetil)-etil]-2,4,6-triyodo-5-lactamidoisofotlamida (Iopamidol) y sus derivados.

15 Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones que comprenden PDGF útiles para facilitar y, en algunas formas de realización, acelerar la consolidación de las fracturas.

20 Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición que comprende PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y métodos de uso de tales composiciones como alternativa al injerto óseo autólogo en el tratamiento de fracturas.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones que comprenden PDGF útiles para el refuerzo de hueso.

30 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones que comprenden PDGF útiles para el refuerzo de hueso debilitado.

35 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones que comprenden PDGF útiles para el refuerzo de hueso sometido a cambios compensatorios en la carga de peso.

40 Aún otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones que comprenden PDGF útiles para el refuerzo de hueso debilitado debido a cambios compensatorios en la carga de peso, tal como las vértebras adyacentes a una vértebra dañada, o un fémur contralateral a una cadera o fémur lesionados.

45 Estas y otras formas de realización de la presente invención se describen con mayor detalle en la descripción detallada que sigue a continuación. Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes después de revisar la siguiente descripción detallada de las formas de realización y reivindicaciones descritas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 La Figura 1 muestra fotomicrografías de los procesos de consolidación en un sitio de fractura ósea no tratado en una rata con osteoporosis.

La figura 2 muestra fotomicrografías de los procesos de consolidación en un sitio de fractura ósea en una rata con osteoporosis, tratado con un material de armazón óseo.

55 La Figura 3 muestra fotomicrografías de los procesos de consolidación en un sitio de fractura ósea en una rata con osteoporosis, tratado con una composición que comprende una solución de PDGF y una matriz biocompatible según una forma de realización de la presente invención.

La Figura 4 muestra fotomicrografías de los procesos de consolidación en un sitio de fractura ósea en una rata con osteoporosis, tratado con una composición que comprende una solución de PDGF y una matriz biocompatible según una forma de realización de la presente invención.

60 La Figura 5 muestra imágenes de microtomografía computarizada (micro-TC) de sitios de fractura ósea tratados y no tratados en ratas con osteoporosis según formas de realización de la presente invención.

La figura 6 ilustra una jeringa y un aparato relacionado penetrando el tejido superpuesto a un cuerpo vertebral para administrar una composición de la presente invención al cuerpo vertebral según una forma de realización de la presente invención.

65 La Figura 7 es una radiografía que ilustra la inyección de una composición en un cuerpo vertebral según una forma de realización de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 La presente descripción proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de hueso. El hueso puede ser hueso normal o hueso deteriorado. El hueso deteriorado, tal como se utiliza en el presente documento, comprende hueso que está dañado, enfermo, debilitado o que es funcionalmente defectuoso de otra manera. El hueso deteriorado por ejemplo, puede incluir hueso fracturado y hueso de baja densidad por cualquier causa incluida pero no limitada a enfermedades tales como la osteoporosis, el uso de corticosteroides o el tabaquismo. La presente invención también puede emplearse para el tratamiento profiláctico de hueso que puede verse perjudicialmente afectado por factores que pueden añadir tensión al hueso o afectar al hueso de otro modo.

10 La presente descripción prevé el uso de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de hueso. La presente descripción también prevé el uso de las composiciones de la presente invención en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de hueso.

15 En una forma de realización, la composición comprende una solución que comprende PDGF y una matriz biocompatible, en la que la solución está dispuesta en la matriz biocompatible. En otra forma de realización, una composición comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible, en la que la matriz biocompatible comprende un material de armazón óseo y un aglutinante biocompatible. En un aspecto, las matrices biocompatibles pueden incluir partículas de fosfato cálcico con o sin aglutinantes biocompatibles o aloinjerto óseo tal como aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado (DFDBA) o matriz ósea desmineralizada particulada (DBM). En otro aspecto, las matrices biocompatibles pueden ser DFDBA o matriz ósea desmineralizada particulada DBM.

25 Las composiciones de la presente descripción se utilizan para facilitar el refuerzo y la consolidación del hueso, incluido hueso fracturado. Puede tratarse cualquier hueso con las composiciones de la presente invención, incluido pero no limitado al húmero, cúbito, radio, fémur, tibia, peroné, rótula, huesos del tobillo, huesos de la muñeca, carpianos, metacarpianos, falanges, tarsos, metatarsos, costillas, esternón, vértebras, escápula, clavícula, pelvis, sacro y huesos craneofaciales. En las formas de realización específicas, el radio, el fémur, la tibia y las vértebras se tratan con las composiciones y los métodos de la presente invención.

30 En una forma de realización, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de fracturas del radio distal y de las estructuras anatómicas relacionadas de la muñeca. Las presentes composiciones y métodos facilitan y, en algunos casos, aceleran la respuesta de consolidación en fracturas del radio distal, incluida la unión ósea del sitio de fractura. En una forma de realización, las composiciones comprenden una solución que comprende PDGF y una matriz biocompatible, en la que la solución está dispuesta en la matriz biocompatible. En otra forma de realización, las composiciones comprenden una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible, en la que la matriz biocompatible comprende un material de armazón óseo y un aglutinante biocompatible. En otra forma de realización, la presente invención proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de fracturas de tibia. En otra forma de realización, la presente descripción proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de fracturas vertebrales o para el refuerzo de las vértebras adyacentes a una vértebra dañada. Según formas de realización descritas en el presente documento, la presente invención proporciona composiciones para promover la formación de hueso en un cuerpo vertebral y composiciones para prevenir o disminuir la probabilidad de fracturas vertebrales por compresión, incluidas las fracturas vertebrales secundarias por compresión.

45 A continuación, volviendo a los componentes que pueden incluirse en diversas formas de realización de la presente descripción, las composiciones de la presente descripción comprenden una solución que comprende PDGF.

Soluciones de PDGF

50 El PDGF juega un papel importante en la regulación del crecimiento y división celular. El PDGF, al igual que con otros factores de crecimiento, es capaz de unirse con los dominios extracelulares de los receptores de tirosina quinasa. La unión del PDGF a estas proteínas transmembrana pone en marcha la actividad quinasa de sus dominios catalíticos situados en el lado citosólico de la membrana. Mediante la fosforilación de los residuos de tirosina de las proteínas diana, las quinasa inducen una variedad de procesos celulares que incluyen el crecimiento celular y la producción de matriz extracelular.

60 Una composición proporcionada por la presente descripción puede comprender una solución que comprende factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y una matriz biocompatible, en la que la solución está dispuesta en la matriz biocompatible. En algunas formas de realización, el PDGF está presente en la solución a una concentración que va desde aproximadamente 0,01 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml, desde aproximadamente 0,05 mg/ml hasta aproximadamente 5 mg/ml, o desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 1,0 mg/ml. El PDGF puede estar presente en la solución a cualquier concentración dentro de estos intervalos indicados. En otras formas de realización, el PDGF está presente en la solución a cualquiera de las siguientes concentraciones: aproximadamente 0,05 mg/ml; aproximadamente 0,1 mg/ml; aproximadamente 0,15 mg/ml; aproximadamente 0,2 mg/ml; aproximadamente 0,25 mg/ml, aproximadamente 0,3 mg/ml, aproximadamente 0,35 mg/ml, aproximadamente 0,4 mg/ml, aproximadamente 0,45 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente

0,55 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,65 mg/ml, aproximadamente 0,7 mg/ml, aproximadamente 0,75 mg/ml, aproximadamente 0,8 mg/ml, aproximadamente 0,85 mg/ml, aproximadamente 0,9 mg/ml, aproximadamente 0,95 mg/ml o aproximadamente 1,0 mg/ml. Debe entenderse que estas concentraciones son simplemente ejemplos de formas de realización concretas, y que la concentración de PDGF puede estar dentro de cualquiera de los intervalos de concentración indicados anteriormente.

En las composiciones de la presente descripción pueden utilizarse diversas cantidades de PDGF. Las cantidades de PDGF que podrían utilizarse incluyen cantidades en los siguientes intervalos: de aproximadamente 1 ug a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 10 ug a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 100 ug a aproximadamente 10 mg, y de aproximadamente 250 ug a aproximadamente 5 mg.

La concentración de PDGF o de otros factores de crecimiento en las formas de realización de la presente invención puede determinarse mediante el uso de un inmunoensayo ligado a enzimas como se describe en las patentes de EE.UU. N<sup>os</sup> 6.221.625, 5.747.273 y 5.290.708, o cualquier otro ensayo conocido en la técnica para determinar la concentración de PDGF. Cuando se proporciona en el presente documento, la concentración molar de PDGF se determina en base al peso molecular del dímero de PDGF (por ejemplo, PDGF-BB; MW aproximadamente 25 kDa).

En las formas de realización de la presente invención, el PDGF comprende homodímeros y heterodímeros de PDGF, incluidos PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD, y mezclas y derivados de los mismos. En una forma de realización, el PDGF comprende PDGF-BB. En otra forma de realización el PDGF comprende un PDGF humano recombinante, tal como rhPDGF-BB.

El PDGF, en algunas formas de realización, puede obtenerse de fuentes naturales. En otras formas de realización, el PDGF puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante. En otras formas de realización, el PDGF o fragmentos del mismo pueden producirse utilizando técnicas de síntesis de péptidos conocidas para un experto habitual en la técnica, tal como la síntesis de péptidos en fase sólida. Cuando se obtiene de fuentes naturales, el PDGF puede obtenerse a partir de fluidos biológicos. Los fluidos biológicos, según algunas formas de realización, pueden comprender cualquier fluido tratado o no tratado asociado con los organismos vivos, incluida la sangre.

Los fluidos biológicos, en otra forma de realización, también pueden comprender componentes de la sangre, incluidos concentrado de plaquetas (PC), plaquetas de aféresis, plasma rico en plaquetas (PRP), plasma, suero, plasma fresco congelado (FFP) y capa leucocitaria (BC). Los fluidos biológicos, en una forma de realización adicional, pueden comprender plaquetas separadas del plasma y resuspendidas en un fluido fisiológico.

Cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, puede insertarse una secuencia de ADN que codifica un único monómero (por ejemplo, la cadena B o la cadena A de PDGF), en algunas formas de realización, en células procariotas o eucariotas cultivadas para su expresión, para que produzcan posteriormente el homodímero (por ejemplo, PDGF-BB o PDGF-AA). En otras formas de realización, puede generarse un heterodímero de PDGF insertando secuencias de ADN que codifican para las dos unidades monoméricas del heterodímero en células procariotas o eucariotas cultivadas y permitiendo que las unidades monoméricas traducidos sean procesadas por las células para producir el heterodímero (por ejemplo, PDGF-AB). Puede obtenerse en el mercado PDGF-BB recombinante AMPc disponible en el mercado de Chiron Corporation (Emeryville, CA). Puede obtenerse rhPDGF-BB de uso en investigación de múltiples fuentes, incluidas R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN), BD Biosciences (San José, CA) y Chemicon, Internacional (Temecula, CA).

En las formas de realización de la presente invención, el PDGF comprende fragmentos de PDGF. En una forma de realización el rhPDGF-B comprende los siguientes fragmentos: secuencias de aminoácidos 1-31, 1-32, 33-108, 33-109 y/o 1-108 de la totalidad de la cadena B. La secuencia de aminoácidos completa (1-109) de la cadena B de PDGF se proporciona en la Figura 15 de la patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 5.516.896. Debe entenderse que las composiciones de rhPDGF de la presente invención pueden comprender una combinación de rhPDGF-B intacto (1-109) y fragmentos de los mismos. Pueden emplearse otros fragmentos de PDGF tales como los descritos en la patente de EE.UU. N<sup>o</sup> 5.516.896. Según una forma de realización, el rhPDGF-BB comprende al menos un 65% de rhPDGF-B intacto (1-109). Según otras formas de realización preferentes, el rhPDGF-BB comprende al menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 99% de rhPDGF-B intacto (1-109).

En algunas formas de realización de la presente invención, el PDGF puede purificarse. El PDGF purificado, tal como se utiliza en el presente documento, comprende composiciones que tienen más de aproximadamente un 95% en peso de PDGF antes de su incorporación en las soluciones de la presente invención. La solución puede ser cualquier solución farmacéuticamente aceptable. En otras formas de realización, el PDGF puede estar sustancialmente purificado. El PDGF sustancialmente purificado, tal como se utiliza en el presente documento, comprende composiciones que tienen de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 95% en peso de PDGF antes de su incorporación a las soluciones de la presente invención. En una forma de realización, el PDGF sustancialmente purificado comprende composiciones que tienen de aproximadamente un 65% a aproximadamente un 95% en peso de PDGF antes de su incorporación a las soluciones de la presente invención. En otras formas de realización, el PDGF sustancialmente purificado comprende composiciones que tienen de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 75% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un



80% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 85% a aproximadamente un 95%, o de aproximadamente un 90% a aproximadamente un 95% en peso de PDGF, antes de su incorporación a las soluciones de la presente invención. El PDGF purificado y el PDGF sustancialmente purificado pueden incorporarse a armazones y aglutinantes.

5 En una forma de realización adicional, el PDGF pueden estar parcialmente purificado. El PDGF parcialmente purificado, tal como se utiliza en el presente documento, comprende composiciones que tienen PDGF en el contexto del plasma rico en plaquetas (PRP), plasma fresco congelado (FFP), o cualquier otro producto de la sangre que requiere la recolección y separación para producir PDGF. Las formas de realización de la presente invención  
10 contemplan que pueda purificarse o purificarse parcialmente cualquiera de las isoformas de PDGF proporcionadas en el presente documento, incluidos los homodímeros y heterodímeros. Las composiciones de la presente invención que contienen mezclas de PDGF pueden contener isoformas de PDGF o fragmentos de PDGF en proporciones parcialmente purificadas. Puede prepararse PDGF purificado y parcialmente purificado, en algunas formas de realización, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. con N° de serie 11/159.533 (n° de publicación: 20060084602).

15 En algunas formas de realización, las soluciones que comprenden PDGF se forman solubilizando PDGF en uno o más tampones. Los tampones adecuados para su uso en las soluciones de PDGF de la presente invención pueden comprender, pero no se limitan a, carbonatos, fosfatos (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), histidina, acetatos (por ejemplo, acetato de sodio), tampones ácidos tales como ácido acético y HCl, y tampones orgánicos tales como lisina, tampones Tris (por ejemplo, tris(hidroximetil)aminoetano), ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS). Los tampones pueden seleccionarse en base a su biocompatibilidad con el PDGF y la capacidad del tampón para impedir la modificación indeseable de proteínas. Los tampones pueden seleccionarse adicionalmente en base a la  
20 compatibilidad con los tejidos del hospedador. En una forma de realización preferente, se utiliza tampón de acetato de sodio. Los tampones pueden emplearse a diferentes molaridades, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM, o cualquier molaridad dentro de estos intervalos. En una forma de realización, se emplea un tampón de acetato a una molaridad de aproximadamente 20 mM.

25 En otra forma de realización, las soluciones que comprenden PDGF se forman solubilizando PDGF liofilizado en agua, en la que antes de la solubilización el PDGF se liofiliza a partir de un tampón apropiado.

35 Las soluciones que comprenden PDGF, según formas de realización de la presente invención, pueden tener un pH que va desde aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 8,0. En una forma de realización, una solución que comprende PDGF tiene un pH que va desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 8,0, más preferentemente desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,0, lo más preferentemente desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 6,5, o cualquier valor dentro de estos intervalos. El pH de las  
40 soluciones que comprenden PDGF, en algunas formas de realización, puede ser compatible con la eficacia y la estabilidad prolongada del PDGF o de cualquier otro agente biológicamente activo deseado. El PDGF es generalmente más estable en un entorno ácido. Por lo tanto, según una forma de realización, la presente invención comprende una formulación de almacenamiento ácido de una solución de PDGF. Según esta forma de realización, la solución de PDGF tiene preferentemente un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0, y más preferentemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,5. Sin embargo, puede optimizarse la actividad biológica del PDGF en una solución con un intervalo de pH neutro. Por lo tanto, en una forma de realización adicional, la presente invención comprende una formulación de pH neutro de una solución de PDGF. Según esta forma de realización, la solución de PDGF tiene preferentemente un pH de aproximadamente 5,0 a  
45 aproximadamente 8,0, más preferentemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0, lo más preferentemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Según un método de la presente descripción, se reformula una solución ácida de PDGF a una composición de pH neutro, en la que a continuación se utiliza dicha composición para tratar fracturas del radio distal y de las estructuras anatómicas relacionadas de la muñeca para promover el crecimiento óseo. Según una forma de realización preferente de la presente invención, el PDGF utilizado en las soluciones es rhPDGF-BB.

50 En algunas formas de realización, puede modificarse el pH de la solución que contiene el PDGF para optimizar la cinética de unión del PDGF a un enlazador o sustrato matriz. Si se desea, a medida que el pH del material se equilibra al del material adyacente, el PDGF unido puede hacerse lábil.

60 El pH de las soluciones que comprenden PDGF, en algunas formas de realización, puede controlarse mediante los tampones mencionados en el presente documento. Diversas proteínas muestran diferentes intervalos de pH en los que son estables. Las estabildades de las proteínas son reflejadas principalmente por los puntos isoelectrónicos y las cargas en las proteínas. El intervalo de pH puede influir en la estructura conformacional de una proteína y la susceptibilidad de una proteína a la hidrólisis, la oxidación, la degradación proteolítica, y otros procesos que pueden  
65 dar como resultado la modificación de la estructura y/o la actividad biológica de la proteína.

En algunas formas de realización, las soluciones que comprenden PDGF pueden comprender adicionalmente componentes adicionales tales como otros agentes biológicamente activos. En otras formas de realización, las soluciones que comprenden PDGF pueden comprender adicionalmente medios de cultivo celular, otras proteínas estabilizadoras tales como albúmina, agentes antibacterianos, inhibidores de proteasas [por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), aprotinina, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (EACA), etc.] y/u otros factores de crecimiento tales como factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformantes (TGF), factores de crecimiento de queratinocitos (KGFs), factores de crecimiento insulinoideos (IGF), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), u otros PDGF, incluidas composiciones de PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC y/o PDGF-DD.

Además de las soluciones que comprenden PDGF, las composiciones de la presente invención también comprenden una matriz biocompatible en la que disponer las soluciones de PDGF y también pueden comprender un aglutinante biocompatible, ya sea con o sin una matriz biocompatible.

#### Matriz biocompatible

##### *Material de armazón*

Una matriz biocompatible, según formas de realización de la presente invención, comprende un material de armazón. El material de armazón, según formas de realización de la presente invención, proporciona la estructura o el armazón para que se produzca nuevo tejido y/o el crecimiento del hueso. Un material de armazón, en algunas formas de realización, comprende al menos un fosfato cálcico. En otras formas de realización, un material de armazón puede comprender una pluralidad de fosfatos cálcicos. Los fosfatos cálcicos adecuados para su uso como material de armazón, en formas de realización de la presente invención, tienen una relación atómica entre calcio y fósforo que va desde 0,5 hasta 2,0. En algunas formas de realización, la matriz biocompatible puede comprender un aloinjerto tal como aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado (DFDBA) o matriz ósea desmineralizada particulada (DBM).

Los ejemplos no limitativos de fosfatos cálcicos adecuados para su uso como materiales de armazón comprenden fosfato cálcico amorfo, fosfato monocálcico monohidratado (MCPM), fosfato monocálcico anhidro (MCPA), fosfato dicálcico dihidratado (DCPD), fosfato dicálcico anhidro (DCPA), fosfato octacálcico (OCP),  $\alpha$ -fosfato tricálcico,  $\beta$ -fosfato tricálcico, hidroxiapatita (OHAp), hidroxiapatita poco cristalina, fosfato tetracálcico (TTCP), decafosfato heptacálcico, metafosfato cálcico, pirofosfato cálcico dihidratado, fosfato cálcico carbonatado y pirofosfato cálcico.

En algunas formas de realización, un material de armazón comprende una estructura porosa. Los materiales de armazón porosos, según algunas formas de realización, pueden comprender poros con diámetros que van desde aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 1 mm. En una forma de realización, un material de armazón comprende macroporos con diámetros que van desde aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 1 mm. En otra forma de realización, un material de armazón comprende mesoporos con diámetros que van desde aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ . En una forma de realización adicional, un material de armazón comprende microporos con diámetros inferiores a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Las formas de realización de la presente invención contemplan materiales de armazón que comprenden macroporos, mesoporos y microporos, o cualquier combinación de los mismos.

Un material de armazón poroso, en una forma de realización, tiene una porosidad superior a aproximadamente un 25%. En otra forma de realización, un material de armazón poroso tiene una porosidad superior a aproximadamente un 50%. En una forma de realización adicional, un material de armazón poroso tiene una porosidad superior a aproximadamente un 90%.

En algunas formas de realización, un material de armazón comprende una pluralidad de partículas. Un material de armazón, por ejemplo, puede comprender una pluralidad de partículas de fosfato cálcico. Las partículas del armazón, en una forma de realización, tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 5 mm. En otras formas de realización, las partículas tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 750  $\mu\text{m}$ . Las partículas del armazón, en otra forma de realización, tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ . En una forma de realización adicional, las partículas tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 75  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ . En formas de realización adicionales, las partículas del armazón tienen un diámetro medio inferior a aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y, en algunos casos, superior a aproximadamente 1 mm.

Los materiales de armazón, según algunas formas de realización, pueden proporcionarse con una forma adecuada su implante (por ejemplo, una esfera, un cilindro o un bloque). En otras formas de realización, los materiales de armazón son moldeables, extrusionables y/o inyectables. Los materiales de armazón óseo moldeables pueden facilitar la colocación eficaz de las composiciones de la presente invención en y alrededor de los sitios diana en el hueso. En algunas formas de realización, los materiales de armazón moldeables se aplican al hueso con una espátula o con un dispositivo equivalente. En algunas formas de realización, los materiales de armazón pueden fluir.

Los materiales de armazón fluidos, en algunas formas de realización, pueden aplicarse a fracturas óseas mediante una jeringa y aguja o cánula. En algunas formas de realización, los materiales de armazón fluidos pueden aplicarse al hueso por vía percutánea. En otras formas de realización, los materiales de armazón fluidos pueden aplicarse a una fractura ósea expuesta quirúrgicamente.

5 En algunas formas de realización, los materiales de armazón son biorreabsorbibles. Un material de armazón, en una forma de realización, puede reabsorberse dentro del primer año de su implante *in vivo*. En otra forma de realización, un material de armazón puede reabsorberse en de un período de 1, 3, 6 ó 9 meses desde su implante *in vivo*. La capacidad de biorreabsorción dependerá de: (1) la naturaleza del material de la matriz (es decir, su composición química, estructura física y tamaño); (2) la ubicación dentro del cuerpo en el que se coloca la matriz; (3) la cantidad utilizada de material de la matriz; (4) el estado metabólico del paciente (diabético/no diabético, con osteoporosis, fumador, de edad avanzada, uso de esteroides, etc.); (5) la gravedad y/o el tipo de lesión tratada; y (6) el uso de otros materiales, además de la matriz, tales como otros factores de anabolismo, catabolismo y anticatabolismo óseo.

15 Armazones que comprenden  $\beta$ -fosfato tricálcico

Un material de armazón para su uso como matriz biocompatible, en algunas formas de realización, comprende  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). El  $\beta$ -TCP, según algunas formas de realización, puede comprender una estructura porosa con unos poros interconectados y multidireccionales de diámetros variables. En algunas formas de realización, el  $\beta$ -TCP comprende una pluralidad de cavidades y poros no interconectados de diversos diámetros, además de los poros interconectados. La estructura porosa del  $\beta$ -TCP, en una forma de realización, comprende macroporos con diámetros que van desde aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 1 mm, mesoporos con diámetros que van desde aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , y microporos con diámetros inferiores a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Los macroporos y microporos del  $\beta$ -TCP pueden facilitar el crecimiento interno del tejido, incluida la osteoinducción y la osteoconducción al tiempo que los macroporos, mesoporos y microporos pueden permitir la comunicación de fluidos y el transporte de nutrientes para ayudar a regenerar el tejido y el hueso, por toda la matriz biocompatible de  $\beta$ -TCP.

30 Cuando comprende una estructura porosa, el  $\beta$ -TCP, en algunas formas de realización, puede tener una porosidad superior a un 25%. En otras formas de realización, el  $\beta$ -TCP puede tener una porosidad superior a un 50%. En una forma de realización adicional, el  $\beta$ -TCP puede tener una porosidad superior a un 90%.

En algunas formas de realización, un material de armazón comprende partículas de  $\beta$ -TCP. Las partículas de  $\alpha$ -TCP, en una forma de realización, tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 5 mm. En otras formas de realización, las partículas de  $\beta$ -TCP tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 750  $\mu\text{m}$ . En otra forma de realización, las partículas de  $\beta$ -TCP tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ . En una forma de realización adicional, las partículas de  $\beta$ -TCP tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 75  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ . En formas de realización adicionales, las partículas de  $\beta$ -TCP tienen un diámetro medio de tamaños inferiores a aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  y, en algunos casos, los tamaños son inferiores a 1  $\mu\text{m}$ .

45 Se proporciona una matriz biocompatible que comprende un material de armazón de  $\beta$ -TCP, en algunas formas de realización, en una forma adecuada para su implante (por ejemplo, una esfera, un cilindro o un bloque). En otras formas de realización, un material de armazón de  $\beta$ -TCP es moldeable, extrusionable y/o fluido, facilitando de este modo la aplicación de la matriz a sitios de fractura en el radio distal. Las matrices fluidas pueden aplicarse a través de jeringas, tubos o espátulas.

50 Un material de armazón de  $\beta$ -TCP, según algunas formas de realización, es biorreabsorbible. En una forma de realización, un material de armazón de  $\beta$ -TCP puede ser reabsorbido en al menos un 75% al año de ser implantado *in vivo*. En otra forma de realización, un material de armazón de  $\beta$ -TCP puede ser reabsorbido en más de un 90% al año de ser implantado *in vivo*.

55 Material de armazón y aglutinante biocompatible

En otra forma de realización, una matriz biocompatible comprende un material de armazón y un aglutinante biocompatible.

60 Los aglutinantes biocompatibles, según algunas formas de realización, pueden comprender materiales capaces de promover la cohesión entre sustancias combinadas. Un aglutinante biocompatible, por ejemplo, puede promover la adhesión entre las partículas de un material de armazón en la formación de una matriz biocompatible. En determinadas formas de realización, el mismo material puede servir como material de armazón y como aglutinante si tal material actúa para promover la cohesión entre las sustancias combinadas y proporciona una estructura para que se produzca el crecimiento de nuevo tejido, incluido el crecimiento de hueso.

65

5 Los aglutinantes biocompatibles, en algunas formas de realización, pueden comprender colágeno, elastina, polisacáridos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, proteínas, polipéptidos, poli(ácidos  $\alpha$ -hidroxiácidos), poli(lactonas), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poliuretanos, poli(ortoésteres), poli(anhídrido-co-imidas), poli(ortocarbonatos), poli( $\alpha$ -hidroxi alcanooatos), poli(dioxanonas), poli(fosfoésteres), ácido poliláctico, poli(L-lactida) (PLLA), poli(D,L-lactida) (PDLLA), poliglicolida (PGA), poli(lactida-co-glicolida) (PLGA), poli(L-lactida-co-D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-carbonato de trimetileno), ácido poliglicólico, polihidroxibutirato (PHB), poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli( $\delta$ -valerolactona), poli( $\gamma$ -butirolactona), poli(caprolactona), ácido poliacrílico, ácido policarboxílico, poli(clorhidrato de alilamina), poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(etilenimina), fumarato de polipropileno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polietileno, polimetilmetacrilato, fibras de carbono, poli(etileno glicol), poli(óxido de etileno), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), poli(etiloxazolina), copolímeros de bloque de poli(óxido de etileno)-co-poli(óxido de propileno), poli(tereftalato de etileno)poliamida, y copolímeros y mezclas de los mismos.

15 Los aglutinantes biocompatibles, en otras formas de realización, pueden comprender ácido alginico, goma arábica, goma de guar, goma de xantano, gelatina, quitina, quitosano, acetato de quitosano, lactato de quitosano, sulfato de condroitina, N,O-carboximetil quitosano, un dextrano (por ejemplo,  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina o dextrano sulfato de sodio), cola de fibrina, lecitina, derivados de fosfatidilcolina, glicerol, ácido hialurónico, hialuronato de sodio, una celulosa (por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa o hidroxietilcelulosa), una glucosamina, un proteoglicano, un almidón (por ejemplo, almidón de hidroxietilo o almidón soluble), ácido láctico, ácidos plurónicos, glicerofosfato de sodio, glucógeno, una queratina, seda, y derivados y mezclas de los mismos.

25 En algunas formas de realización, un aglutinante biocompatible es soluble en agua. Un aglutinante soluble en agua puede disolverse a partir de la matriz biocompatible poco después de ser implantado, introduciendo de este modo macroporosidad en la matriz biocompatible. La macroporosidad, como se analiza en el presente documento, puede aumentar la osteoconductividad del material de implante potenciando el acceso y, en consecuencia, la actividad de remodelado de los osteoclastos y los osteoblastos en el sitio del implante.

30 En algunas formas de realización, un aglutinante biocompatible puede estar presente en una matriz biocompatible en una cantidad que va desde aproximadamente un por ciento en peso hasta aproximadamente un 50 por ciento en peso de la matriz. En otras formas de realización, un aglutinante biocompatible puede estar presente en una cantidad que va desde aproximadamente un 10 por ciento en peso hasta aproximadamente un 40 por ciento en peso de la matriz biocompatible. En otra forma de realización, un aglutinante biocompatible puede estar presente en una cantidad que va desde aproximadamente un 15 por ciento en peso hasta aproximadamente un 35 por ciento en peso de la matriz biocompatible. En una forma de realización adicional, un aglutinante biocompatible puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 20 por ciento en peso de la matriz biocompatible.

40 Una matriz biocompatible que comprende un material de armazón y un aglutinante biocompatible, según algunas formas de realización, puede ser moldeable, extrusionable y/o fluida. En tales formas de realización, una matriz biocompatible puede estar en forma de pasta o masilla. Una matriz biocompatible en forma de pasta o masilla, en una forma de realización, puede comprender partículas de un material de armazón adheridas entre sí mediante un aglutinante biocompatible.

45 Una matriz biocompatible en forma de pasta o masilla puede moldearse en la forma de implante deseada o puede moldearse para adaptarse a los contornos de la zona de implante. En una forma de realización, puede inyectarse una matriz biocompatible en forma de pasta o masilla en un sitio de implante con una jeringa o cánula.

50 En algunas formas de realización, una matriz biocompatible en forma de pasta o masilla no se endurece y conserva una forma fluida y moldeable con posterioridad a ser implantada. En otras formas de realización, una pasta o masilla puede endurecerse con posterioridad a ser implantada, reduciendo de ese modo la moldeabilidad y fluidez de la matriz.

55 Una matriz biocompatible que comprende un material de armazón y un aglutinante biocompatible, en algunas formas de realización, también puede proporcionarse con una forma predeterminada incluida un bloque, una esfera o un cilindro, o cualquier forma deseada, por ejemplo una forma definida por un molde o un sitio de aplicación.

60 Una matriz biocompatible que comprende un material de armazón y un aglutinante biocompatible, en algunas formas de realización, es biorreabsorbible. Una matriz biocompatible, en tales formas de realización, puede reabsorberse en el plazo de un año desde su implante *in vivo*. En otra forma de realización, una matriz biocompatible que comprende un material de armazón y un aglutinante biocompatible puede reabsorberse en un período de 1, 3, 6 ó 9 meses desde su implante *in vivo*. La capacidad de biorreabsorción dependerá de: (1) la naturaleza del material de la matriz (es decir, su composición química, estructura física y tamaño); (2) la ubicación dentro del cuerpo en el que se coloca la matriz; (3) la cantidad utilizada de material de la matriz; (4) el estado metabólico del paciente (diabético/no diabético, con osteoporosis, fumador, de edad avanzada, uso de esteroides, etc.); (5) la gravedad y/o tipo de lesiones tratadas; y (6) el uso de otros materiales además de la matriz ósea, tales como otros factores de anabolismo, catabolismo y anticatabolismo óseo.

Matriz biocompatible que comprende  $\beta$ -TCP y colágeno

5 En algunas formas de realización, una matriz biocompatible puede comprender un material de armazón de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno biocompatible. Los materiales de armazón de  $\beta$ -TCP adecuados para la combinación con un aglutinante de colágeno están en conformidad con los proporcionados anteriormente en el presente documento.

10 Un aglutinante de colágeno, en algunas formas de realización, comprende cualquier tipo de colágeno, incluidos los colágenos de tipo I, de tipo II y de tipo III. En una forma de realización, un aglutinante de colágeno comprende una mezcla de colágenos, tal como una mezcla colágeno de tipo I y de tipo II. En otras formas de realización, un aglutinante de colágeno es soluble en condiciones fisiológicas. Pueden emplearse otros tipos de colágeno presentes en el hueso o en los tejidos musculoesqueléticos. En la presente invención pueden utilizarse formas de colágeno recombinantes, sintéticas y de origen natural.

15 Una matriz biocompatible, según algunas formas de realización, puede comprender una pluralidad de partículas de  $\beta$ -TCP adheridas entre sí con un aglutinante de colágeno. En una forma de realización, las partículas de  $\beta$ -TCP adecuadas para combinarse con un aglutinante de colágeno tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 1  $\mu$ m hasta aproximadamente 5 mm. En otra forma de realización, las partículas de  $\beta$ -TCP adecuadas para combinarse con un aglutinante de colágeno tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 1  $\mu$ m hasta aproximadamente 1 mm. En otras formas de realización, las partículas de  $\beta$ -TCP tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 200  $\mu$ m hasta aproximadamente 3 mm o desde aproximadamente 200  $\mu$ m hasta aproximadamente 1 mm, o desde aproximadamente 1 mm hasta aproximadamente 2 mm. En algunas formas de realización, las partículas de  $\beta$ -TCP tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 250  $\mu$ m hasta aproximadamente 750  $\mu$ m. Las partículas de  $\beta$ -TCP, en otras formas de realización, tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 100  $\mu$ m hasta aproximadamente 400  $\mu$ m. En una forma de realización adicional, las partículas de  $\beta$ -TCP tienen un diámetro medio que va desde aproximadamente 75  $\mu$ m hasta aproximadamente 300  $\mu$ m. En las formas de realización adicionales, las partículas de  $\beta$ -TCP tienen un diámetro medio inferior a aproximadamente 25  $\mu$ m y, en algunos casos, inferior a aproximadamente 1 mm.

30 Las partículas de  $\beta$ -TCP, en algunas formas de realización, pueden adherirse entre sí mediante el aglutinante de colágeno a fin de producir una matriz biocompatible con una estructura porosa. En algunas formas de realización, una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno puede comprender poros con diámetros que van desde aproximadamente 1  $\mu$ m hasta aproximadamente 1 mm. Una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno puede comprender macroporos con diámetros que van desde aproximadamente 100  $\mu$ m hasta aproximadamente 1 mm, mesoporos con diámetros que van desde aproximadamente 10  $\mu$ m hasta 100  $\mu$ m, y microporos con diámetros inferiores a aproximadamente 10  $\mu$ m.

40 Una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno puede tener una porosidad superior a aproximadamente un 25%. En otra forma de realización, la matriz biocompatible puede tener una porosidad superior a aproximadamente un 50%. En una forma de realización adicional, la matriz biocompatible puede tener una porosidad superior a aproximadamente un 90%.

45 Una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP, en algunas formas de realización, puede comprender un aglutinante de colágeno en una cantidad que va desde aproximadamente un 5 por ciento en peso hasta aproximadamente un 50 por ciento en peso de la matriz. En otras formas de realización, un aglutinante de colágeno puede estar presente en una cantidad que va desde aproximadamente un 10 por ciento en peso hasta aproximadamente un 40 por ciento en peso de la matriz biocompatible. En otra forma de realización, un aglutinante de colágeno puede estar presente en una cantidad que va desde aproximadamente un 15 por ciento en peso hasta aproximadamente un 35 por ciento en peso de la matriz biocompatible. En una forma de realización adicional, un aglutinante de colágeno puede estar presente en una cantidad de aproximadamente un 20 por ciento en peso de la matriz biocompatible.

55 Una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno, según algunas formas de realización puede ser moldeable, extrusionable y/o fluida. En tales formas de realización, la matriz biocompatible puede estar en forma de pasta o masilla. Una pasta o masilla puede moldearse en la forma del implante deseada o puede moldearse para adaptarse a los contornos de la zona de implante. En una forma de realización, puede inyectarse una matriz biocompatible en forma de pasta o masilla que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno en un sitio de implante con una jeringa o cánula.

60 En algunas formas de realización, una matriz biocompatible en forma de pasta o masilla que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno puede conservar una forma fluida y moldeable cuando se implanta. En otras formas de realización, la pasta o masilla se endurece con posterioridad a ser implantada, reduciendo de ese modo la fluidez y moldeabilidad de la matriz.

65 Una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno, en algunas formas de realización, puede proporcionarse con una forma predeterminada, tal como un bloque, una esfera o un cilindro.

Una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno puede ser reabsorbible. En una forma de realización, una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno puede haberse reabsorbido en al menos un 75% al año de ser implantada *in vivo*. En otra forma de realización, una matriz biocompatible que comprende partículas de  $\beta$ -TCP y un aglutinante de colágeno puede haberse reabsorbido en más de un 90% al año de ser implantada *in vivo*.

En algunas formas de realización, una solución que comprende PDGF puede estar dispuesta en una matriz biocompatible para producir una composición para tratar fracturas óseas, tal como fracturas del radio distal y de las estructuras anatómicas relacionadas de la muñeca, o fracturas de tibia.

Disposición de una solución de PDGF en una matriz biocompatible

En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para producir composiciones para su uso en el tratamiento de las fracturas del radio distal. En una forma de realización, un método para producir tales composiciones comprende proporcionar una solución que comprende PDGF, proporcionar una matriz biocompatible, y disponer la solución en la matriz biocompatible. Las soluciones de PDGF y matrices biocompatibles adecuadas para la combinación están en conformidad con las descritas anteriormente en el presente documento.

En algunas formas de realización, puede disponerse una solución de PDGF en una matriz biocompatible empapando la matriz biocompatible en la solución de PDGF. Una solución de PDGF, en otra forma de realización, puede disponerse en una matriz biocompatible inyectando en la matriz biocompatible la solución de PDGF. En algunas formas de realización, inyectar una solución de PDGF puede comprender disponer la solución de PDGF en una jeringa y expulsar la solución de PDGF en la matriz biocompatible para saturar la matriz biocompatible.

La matriz biocompatible, según algunas formas de realización, puede estar en una forma predeterminada, tal como un ladrillo o cilindro, antes de recibir una solución de PDGF. Después de recibir una solución de PDGF, la matriz biocompatible puede tener forma de pasta o masilla que es extrusionable, inyectable y/o fluida. En otras formas de realización, la matriz biocompatible puede presentar forma de pasta o masilla fluida antes de recibir una solución que comprende PDGF.

Composiciones que comprenden adicionalmente agentes de contraste

En algunas formas de realización, las composiciones que comprenden una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible para tratar hueso o promover la formación de hueso, por ejemplo, en un cuerpo vertebral, comprenden adicionalmente al menos un agente de contraste. Los agentes de contraste, según algunas formas de realización, comprenden agentes de contraste catiónicos, agentes de contraste aniónicos, agentes de contraste no iónicos, o mezclas de los mismos. En algunas formas de realización, los agentes de contraste comprenden agentes de contraste radiopacos. Los agentes de contraste radiopacos, en algunas formas de realización, comprenden compuestos de yodo que incluyen (S)-N,N'-bis[2-hidroxi-1-(hidroximetil)-etil]-2,4,6-triyodo-5-lactamidoisoflamida (Iopamidol) y sus derivados.

En algunas formas de realización, los métodos de producción de composiciones para promover la formación de hueso en los cuerpos vertebrales y prevenir o disminuir la probabilidad de fracturas por compresión en los cuerpos vertebrales comprenden adicionalmente proporcionar al menos un agente de contraste y disponer el al menos un agente de contraste en la matriz biocompatible. En algunas formas de realización, disponer al menos un agente de contraste en una matriz biocompatible comprende combinar el al menos un agente de contraste con una solución de PDGF e inyectar en la matriz biocompatible la solución de PDGF/agente de contraste.

En otra forma de realización, disponer al menos un agente de contraste en una matriz biocompatible comprende combinar el al menos un agente de contraste con una solución de PDGF y empapar la matriz biocompatible en la solución de PDGF/agente de contraste. Como alternativa, en algunas formas de realización, se dispone un agente de contraste en una matriz biocompatible con independencia de la solución de PDGF.

Los agentes de contraste, según algunas formas de realización de la presente invención, facilitan la colocación o aplicación de las composiciones de la presente invención en y alrededor de los cuerpos vertebrales. Los agentes de contraste, según algunas formas de realización, comprenden agentes de contraste catiónicos, agentes de contraste aniónicos, agentes de contraste no iónicos, o mezclas de los mismos. En algunas formas de realización, los agentes de contraste comprenden agentes de contraste radiopacos. Los agentes de contraste radiopacos, en algunas formas de realización, comprenden compuestos de yodo que incluyen (S)-N,N'-bis[2-hidroxi-1-(hidroximetil)-etil]-2,4,6-triyodo-5-lactamidoisoflamida (Iopamidol) y sus derivados.

Composiciones que comprenden adicionalmente agentes biológicamente activos

Las composiciones de la presente invención, según algunas formas de realización, pueden comprender adicionalmente uno o más agentes biológicamente activos, además de PDGF. Los agentes biológicamente activos que pueden incorporarse en las composiciones de la presente invención, además de PDGF, pueden comprender

moléculas orgánicas, materiales inorgánicos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (por ejemplo, genes, fragmentos de genes, secuencias reguladoras de genes de ácidos ribonucleicos con pequeños insertos [si-ARN], factores de transcripción nucleares, y moléculas antisentido), nucleoproteínas, polisacáridos (por ejemplo, heparina), glicoproteínas y lipoproteínas. Se describen ejemplos no limitativos de compuestos biológicamente activos que pueden incorporarse en las composiciones de la presente invención, incluidos, por ejemplo, agentes anticancerosos, antibióticos, analgésicos, antiinflamatorios, inmunosupresores, inhibidores de enzimas, antihistamínicos, hormonas, relajantes musculares, prostaglandinas, factores tróficos, proteínas osteoinductoras, factores de crecimiento y vacunas, en la solicitud de patente de EE.UU. con nº de serie 11/159.533 (Nº de publicación: 20060084602). Los compuestos biológicamente activos preferentes que pueden incorporarse en las composiciones de la presente invención incluyen factores osteoinductores tales como factores de crecimiento insulinoideos, factores de crecimiento de fibroblastos u otros PDGF. Según otras formas de realización, los compuestos biológicamente activos que pueden incorporarse en las composiciones de la presente invención incluyen preferentemente factores osteoinductores y osteoestimuladores tales como proteínas morfogenéticas óseas (BMP), miméticos de BMP, calcitonina o miméticos de la calcitonina, estatinas, derivados de estatina, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento insulinoideos, factores de diferenciación del crecimiento y hormona paratiroidea. Los factores preferentes también incluyen inhibidores de proteasas, así como tratamientos para la osteoporosis que disminuyen la resorción ósea, incluidos bifosfonatos, y los anticuerpos contra el ligando del NF-kB (ligando RANK).

Los regímenes y protocolos convencionales para la administración de agentes biológicamente activos adicionales son bien conocidos en la técnica. Pueden introducirse agentes biológicamente activos adicionales en las composiciones de la presente invención en cantidades que permitan la administración de una dosis apropiada del agente en el sitio del implante. En la mayoría de los casos, las dosis se determinan utilizando directrices conocidas para los profesionales y aplicables al agente concreto en cuestión. La cantidad de un agente biológicamente activo adicional a incluir en una composición de la presente invención puede depender de variables tales como el tipo y la gravedad de la afección, el estado de salud general del paciente concreto, la formulación del agente biológicamente activo, la cinética de liberación, y la capacidad de biorreabsorción de la matriz biocompatible. Pueden utilizarse ensayos clínicos convencionales para optimizar la dosis y frecuencia de dosificación para cualquier agente biológicamente activo adicional concreto.

Una composición de la presente invención, según algunas formas de realización, puede comprender adicionalmente la adición de materiales de injerto adicionales con PDGF, incluidos médula ósea autóloga, extractos autólogos de plaquetas, aloinjertos, materiales sintéticos de la matriz ósea, xenoinjertos, y derivados de los mismos.

#### Métodos para tratar hueso

La presente descripción también proporciona métodos para tratar hueso, incluido hueso deteriorado. En una forma de realización, un método para tratar hueso comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y aplicar la composición al hueso. En algunas formas de realización, aplicar la composición al hueso deteriorado puede comprender moldear la composición para que se adapte a los contornos del hueso deteriorado. Una composición, por ejemplo, puede moldearse en un sitio de fractura ósea llenando de ese modo el volumen creado por la fractura.

Un método para tratar hueso, en otra forma de realización, comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible, disponer la composición en una jeringa, e inyectar la composición en un sitio de hueso deteriorado. En una forma de realización, una composición que comprende PDGF dispuesta en una matriz biocompatible puede inyectarse en el volumen creado por una fractura ósea. Inyectar la composición, en algunas formas de realización, puede comprender penetrar el tejido que rodea o cubre un sitio de hueso deteriorado con la jeringa y depositar la composición en el sitio de hueso deteriorado. En una forma de realización, por ejemplo, una jeringa puede penetrar la piel y el tejido subyacente, tal como el músculo, que cubre un sitio de fractura ósea y depositar posteriormente una composición de la presente invención en y alrededor de la fractura. En una forma de realización de este tipo, pueden minimizarse las técnicas invasivas utilizadas para exponer el sitio de fractura para el tratamiento, tales como incisiones y eliminación de tejido. En otra forma de realización, puede inyectarse en un cuerpo vertebral una composición que comprende PDGF dispuesta en una matriz biocompatible, por ejemplo en un individuo con osteoporosis.

Las composiciones de PDGF de la presente descripción se utilizan para facilitar la consolidación del hueso, incluidas las fracturas óseas. Puede tratarse cualquier hueso con las composiciones de la presente descripción, incluido pero no limitado al húmero, cúbito, radio, fémur, tibia, peroné, rótula, huesos del tobillo, huesos de la muñeca, carpianos, metacarpianos, falanges, tarsos, metatarsos, costillas, esternón, vértebras, escápula, clavícula, pelvis, sacro y huesos craneofaciales.

En una forma de realización, las composiciones de PDGF de la presente descripción pueden aplicarse directamente al hueso fracturado. En otra forma de realización, las composiciones de PDGF de la presente descripción pueden aplicarse al material ortopédico utilizado para facilitar la estabilización de la fractura, por ejemplo, tornillos, clavos intramedulares y otros materiales ortopédicos utilizados por un médico capacitado en la técnica, tal como un cirujano ortopédico. En otra forma de realización, las composiciones de PDGF pueden aplicarse a aberturas en el hueso,

tales como sitios de fracturas por evulsión, agujeros para los tornillos, agujeros para recibir clavos intramedulares, o al canal medular.

5 Las soluciones PDGF y matrices biocompatibles adecuadas para su uso en composiciones para el tratamiento de hueso deteriorado según las formas de realización de la presente invención están en conformidad con las proporcionadas anteriormente en el presente documento.

Métodos para tratar fracturas del radio distal

10 La presente descripción proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de fracturas óseas, incluido el radio, particularmente el radio distal y las estructuras anatómicas asociadas de la muñeca. Las presentes composiciones y métodos facilitan y, en algunas formas de realización, aceleran la respuesta de consolidación en las fracturas del radio distal, incluida la unión ósea del sitio de fractura. Las fracturas del radio distal, según las formas de realización de la presente invención, comprenden todos los tipos de fracturas, incluidas las fracturas intraarticulares y extraarticulares, según lo descrito por el sistema de clasificación AO de fracturas del radio distal.

15 En una forma de realización, las fracturas del radio distal tratadas con las composiciones y métodos de la presente descripción comprenden todos los tipos de fracturas descritas por la clasificación AO de fracturas del radio distal. En algunas formas de realización, una fractura del radio distal comprende una fractura de tipo A (extraarticular). En otras formas de realización, una fractura del radio distal comprende una fractura de tipo B (articular parcial). En otra forma de realización, una fractura del radio distal comprende una fractura de tipo C1 (fractura metafisaria, articular completa y articular simple). En una forma de realización adicional, una fractura del radio distal comprende una fractura de tipo C2 (articular completa, articular simple con fractura metafisaria compleja). En algunas formas de realización, una fractura del radio distal comprende una fractura de tipo C3 (fractura metafisaria, articular completa y articular compleja).

20 En otra forma de realización, un método para tratar una fractura del radio distal comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y aplicar la composición a una fractura en el radio distal. En algunas formas de realización, aplicar la composición comprende inyectar la composición en la fractura del radio distal. En una forma de realización, inyectar comprende la inyección percutánea de la composición en el sitio de fractura. En otra forma de realización, la composición se inyecta en una fractura del radio distal abierta o expuesta quirúrgicamente. En una forma de realización adicional, aplicar comprende disponer la composición en la fractura con una espátula u otro dispositivo. En una forma de realización, los agentes de contraste se combinan opcionalmente con las composiciones de la presente invención con el fin de facilitar la visualización de la composición aplicada o inyectada.

25 En algunas formas de realización, un método para tratar una fractura del radio distal comprende adicionalmente reducir la fractura y/o estabilizar la fractura. Reducir la fractura, según algunas formas de realización, comprende la reducción abierta. En otras formas de realización, reducir la fractura comprende la reducción cerrada. Por otra parte, estabilizar la fractura del radio distal, en algunas formas de realización, comprende aplicar a la fractura un dispositivo de fijación externo o interno, tal como una placa volar.

30 En otra forma de realización, un método para tratar una fractura del radio distal comprende acelerar el nuevo relleno óseo en la fractura, en el que la aceleración comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y aplicar la composición a la fractura.

35 En algunas formas de realización, los métodos para tratar fracturas del radio distal y de las estructuras anatómicas asociadas de la muñeca comprenden adicionalmente proporcionar al menos una composición farmacéutica además de la composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y administrar la al menos una composición farmacéutica a nivel local y/o por vía sistémica. La al menos una composición farmacéutica, en algunas formas de realización, comprende vitaminas, tal como vitamina D<sub>3</sub>, suplementos de calcio, o cualquier inhibidor de los osteoclastos conocido para un experto en la materia, incluidos los bisfosfonatos. En algunas formas de realización, la al menos una composición farmacéutica se administra a nivel local. En tales formas de realización, la al menos una composición farmacéutica puede incorporarse en la matriz biocompatible o disponerse de otro modo en y alrededor de una fractura del radio distal. En otras formas de realización, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía sistémica. En una forma de realización, por ejemplo, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía oral. En otra forma de realización, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía intravenosa.

40 Métodos para tratar los cuerpos vertebrales

45 La presente invención proporciona composiciones y métodos útiles para tratar estructuras de la columna vertebral, incluidos los cuerpos vertebrales. En algunas formas de realización de la presente invención, se proporcionan composiciones para promover la formación de hueso en un cuerpo vertebral. En otras formas de realización, se proporcionan composiciones y métodos para prevenir o disminuir la probabilidad de fracturas vertebrales por compresión. En otra forma de realización, se proporcionan métodos y composiciones para prevenir o disminuir la



probabilidad de fracturas vertebrales secundarias por compresión asociadas con la vertebroplastia y la cifoplastia. Las presentes composiciones y métodos son útiles en el tratamiento de los cuerpos vertebrales de pacientes con osteoporosis.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para promover la formación de hueso en un cuerpo vertebral que comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y aplicar la composición a al menos un cuerpo vertebral. Aplicar la composición a al menos un cuerpo vertebral, en algunas formas de realización, comprende inyectar la composición en el al menos un cuerpo vertebral. En algunas formas de realización, la composición puede aplicarse a una pluralidad de cuerpos vertebrales.

10 Aplicar la composición, en algunas formas de realización, comprende inyectar la composición en al menos un cuerpo vertebral. Las composiciones de la presente invención, en algunas formas de realización, se inyectan en el hueso esponjoso de un cuerpo vertebral. Los cuerpos vertebrales, en algunas formas de realización, comprenden cuerpos vertebrales torácicos, cuerpos vertebrales lumbares, o combinaciones de los mismos. Los cuerpos vertebrales, en algunas formas de realización, comprenden cuerpos vertebrales cervicales, cuerpos vertebrales coccígeos, el sacro, o combinaciones de los mismos.

15

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos que comprenden prevenir o disminuir la probabilidad de fracturas vertebrales por compresión, incluidas las fracturas vertebrales secundarias por compresión. La prevención o la disminución de la probabilidad de fracturas vertebrales por compresión, según formas de realización de la presente invención, comprende proporcionar una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y aplicar la composición a al menos un cuerpo vertebral. En algunas formas de realización, aplicar la composición a al menos un cuerpo vertebral comprende inyectar la composición en el al menos un cuerpo vertebral. En una forma de realización, la composición se aplica a un segundo cuerpo vertebral, en algunos casos un cuerpo vertebral adyacente, con posterioridad a una vertebroplastia o cifoplastia de un primer cuerpo vertebral. En algunas formas de realización, se aplica una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible a al menos un cuerpo vertebral en alto riesgo. "Cuerpos vertebrales en alto riesgo" (HVB), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a los cuerpos vertebrales de las vértebras T5 a T12, así como L1 a L4, que son los que tienen mayor riesgo de sufrir una fractura vertebral secundaria por compresión.

20

25

30 En algunas formas de realización, los métodos para promover la formación de hueso en los cuerpos vertebrales y prevenir o disminuir la probabilidad de fracturas por compresión de los cuerpos vertebrales comprenden adicionalmente proporcionar al menos una composición farmacéutica además de la composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y administrar la al menos una composición farmacéutica a nivel local y/o por vía sistémica. La al menos una composición farmacéutica, en algunas formas de realización, comprende vitaminas, suplementos de calcio, o cualquier inhibidor de los osteoclastos conocido para un experto en la materia, incluidos los bisfosfonatos. En algunas formas de realización, la al menos una composición farmacéutica se administra a nivel local. En tales formas de realización, la al menos una composición farmacéutica puede incorporarse en la matriz biocompatible o disponerse de otro modo en y alrededor de un cuerpo vertebral. En otras formas de realización, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía sistémica.

35

40 En una forma de realización, por ejemplo, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía oral. En otra forma de realización, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía intravenosa.

45 En algunas formas de realización, una composición de la presente invención se aplica a un segundo cuerpo vertebral con posterioridad a la vertebroplastia o cifoplastia de un primer cuerpo vertebral. En algunas formas de realización, el segundo cuerpo vertebral es adyacente al primer cuerpo vertebral. En otras formas de realización, el segundo cuerpo vertebral no es adyacente al primer cuerpo vertebral. En una forma de realización adicional, una composición de la presente invención se aplica a un tercer cuerpo vertebral con posterioridad a la vertebroplastia o cifoplastia de un primer cuerpo vertebral. En algunas formas de realización, el tercer cuerpo vertebral es adyacente al primer cuerpo vertebral. En otras formas de realización, el tercer cuerpo vertebral no es adyacente al primer cuerpo vertebral. Las formas de realización de la presente invención contemplan adicionalmente aplicar las composiciones proporcionadas en el presente documento a una pluralidad de cuerpos vertebrales, incluidos los cuerpos vertebrales en alto riesgo, con posterioridad a la vertebroplastia o cifoplastia de un primer cuerpo vertebral. Debe entenderse que los cuerpos vertebrales primero, segundo y tercero, tal como se utiliza en el presente documento, no se refieren a ninguna posición específica en la columna vertebral, ya que los métodos para inhibir las fracturas vertebrales por compresión, incluidas las fracturas secundarias por compresión, pueden aplicarse a todos los tipos de cuerpos vertebrales, incluidos los cuerpos vertebrales torácicos, cuerpos vertebrales lumbares, cuerpos vertebrales cervicales, cuerpos vertebrales coccígeos y el sacro.

50

55

60 En algunas formas de realización, los métodos para promover la formación de hueso en los cuerpos vertebrales y prevenir o disminuir la probabilidad de fracturas por compresión de los cuerpos vertebrales comprenden adicionalmente proporcionar al menos una composición farmacéutica además de la composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible y administrar la al menos una composición farmacéutica a nivel local y/o por vía sistémica. La al menos una composición farmacéutica, en algunas formas de realización, comprende vitaminas, tales como vitamina D<sub>3</sub>, suplementos de calcio, o cualquier inhibidor de los osteoclastos conocido para un experto en la materia, incluidos los bisfosfonatos. En algunas formas de realización,

65

la al menos una composición farmacéutica que se administra a nivel local. En tales formas de realización, la al menos una composición farmacéutica puede incorporarse en la matriz biocompatible o disponerse de otro modo en y alrededor de un cuerpo vertebral. En otras formas de realización, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía sistémica. En una forma de realización, por ejemplo, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía oral. En otra forma de realización, la al menos una composición farmacéutica se administra al paciente por vía intravenosa.

#### Kits

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit que comprende una solución que comprende PDGF en un primer recipiente y un segundo recipiente que comprende una matriz biocompatible. En algunas formas de realización, la solución comprende una concentración predeterminada de PDGF. La concentración de PDGF puede determinarse según la naturaleza o la clasificación de la fractura que se está tratando. El kit puede comprender adicionalmente un material de armazón óseo y el material de armazón óseo puede comprender adicionalmente un aglutinante biocompatible. Por otra parte, la cantidad de matriz biocompatible proporcionada por un kit puede estar en función de la naturaleza o la clasificación del hueso que se está tratando. La matriz biocompatible que puede incluirse en el kit puede ser un material de armazón óseo, un material de armazón óseo y un aglutinante biocompatible, y/o aloinjerto óseo tal como aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado (DFDBA) o matriz ósea desmineralizada particulada (DBM). En una forma de realización, el material de armazón óseo comprende un fosfato cálcico, tal como  $\beta$ -TCP. Una jeringa puede facilitar la disposición de la solución de PDGF en la matriz biocompatible para su aplicación en un sitio quirúrgico, tal como un sitio de fractura en el hueso. El kit también puede contener instrucciones de uso.

Los siguientes ejemplos servirán para ilustrar adicionalmente la presente invención, sin constituir al mismo tiempo, sin embargo, ninguna limitación de la misma.

#### EJEMPLO 1

##### *Preparación de una composición que comprende una solución de PDGF y una matriz biocompatible*

Se preparó una composición que comprende una solución de PDGF y una matriz biocompatible según el siguiente procedimiento.

Se obtuvo un bloque previamente pesado de matriz biocompatible que comprendía  $\beta$ -TCP y colágeno. El  $\beta$ -TCP comprendía partículas puras de  $\beta$ -TCP con unos tamaños que iban desde aproximadamente 75  $\mu$ m hasta aproximadamente 300  $\mu$ m. Las partículas de  $\beta$ -TCP se formularon con aproximadamente un 20% por ciento en peso de aglutinante de colágeno bovino soluble. Puede obtenerse en el mercado una matriz biocompatible de  $\beta$ -TCP/colágeno de Kensey Nash (Exton, Pensilvania).

Se obtuvo una solución que comprendía rhPDGF-BB. El rhPDGF-BB está disponible en el mercado de Chiron Corporation, a una concentración de solución madre de 10 mg/ml (es decir, Lote # QA2217) en un tampón de acetato de sodio. El rhPDGF-BB es producido en un sistema de expresión de levaduras por Chiron Corporation y procede de la misma planta de producción que el rhPDGF-BB que se utiliza en los productos REGRANEX, (J&J) y GEM 21S (BioMimetic Therapeutics), que ha sido autorizado para su uso humano por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos. Este rhPDGF-BB también está autorizado para su uso humano en la Unión Europea y Canadá. Se diluyó la solución de rhPDGF-BB hasta una concentración de 0,3 mg/ml en el tampón de acetato. La solución de rhPDGF-BB puede diluirse hasta cualquier concentración deseada según las formas de realización de la presente invención.

Para producir la composición se utilizó una relación de aproximadamente 91  $\mu$ l de solución de rhPDGF-BB y aproximadamente 100 mg en peso seco de la matriz biocompatible de  $\beta$ -TCP/colágeno. Se expulsó la solución de rhPDGF-BB en la matriz biocompatible con una jeringa, y se mezcló y moldeó la composición resultante en forma de hebra fina para insertarla en una jeringa de tuberculina de 1 cc para colocarla en un sitio de hueso deteriorado.

#### EJEMPLO 2

##### *Consolidación de fracturas óseas con composiciones que comprenden una solución de PDGF y una matriz biocompatible*

Con el fin de evaluar la eficacia de diversas composiciones para tratar y potenciar la reparación del hueso deteriorado, se llevó a cabo un estudio utilizando ratas con osteoporosis. El modelo utilizado para el presente estudio fue diseñado para imitar la reparación de fracturas óseas en las mujeres posmenopáusicas con deficiencia de estrógenos y propensas a las fracturas osteoporóticas.

El presente estudio se llevó a cabo en la Universidad Carnegie Mellon (CMU), Bone Tissue Engineering Center, Pittsburgh, PA. El estudio fue autorizado por el IACUC de la Universidad de Pittsburgh con Autorización N° 0106070,

y los estudios quirúrgicos se administraron bajo la dirección de la Division of Laboratory Animal Resources (autorizado por la AAALAC) en la Universidad de Pittsburgh.

5 En el estudio se utilizaron ochenta (80) ratas Sprague-Dawley hembra de 1-2 años de edad con un peso de al menos 200 g. cada una. Las ratas se obtuvieron de Harlan (Indianápolis, IN). Las ratas fueron ovariectomizadas (extirpación quirúrgica de los ovarios) en Hilltop Lab Animals, Inc. (Scottsdale, PA) para hacer que las ratas fueran deficientes en estrógeno.

10 Para la ovariectomía, se anestesió a los animales con isofluorano, a continuación se afeitaron y prepararon con alcohol en las regiones lumbar y torácica inferior. Se realizó una incisión longitudinal en la línea media en la piel de la región lumbar inferior, y se realizó una incisión muscular transversal en los lados derecho e izquierdo de la pared corporal directamente sobre la grasa del ovario, que se exteriorizó a través de cualquiera de las incisiones. El cuerno uterino y los vasos sanguíneos que conducen a los ovarios fueron aislados atando una sutura alrededor de ellos. Estos, junto con la grasa adjunta, se eliminaron, y se devolvieron a la cavidad los restos del cuerno uterino.

15 Las ratas ovariectomizadas se alojaron en los Laboratorios Hilltop en jaulas individuales de acero inoxidable durante un máximo de 4 meses para la estabilización tras la ovariectomía. Además, se sometió a las ratas a una dieta calórica reducida en un 30% para asegurar la osteopenia en el transcurso de los 4 meses de recuperación. Las ratas ovariectomizadas se transfirieron a la Universidad Carnegie Mellon y se mantuvieron con la dieta restringida durante  
20 aproximadamente 25 semanas antes de un procedimiento de osteotomía.

25 Después de la ovariectomía y de la dieta, las ratas fueron sometidas a un procedimiento de osteotomía para simular una fractura ósea. Utilizando un procedimiento semiaséptico, se preparó y se cubrió la zona quirúrgica en cada rata en una mesa de operaciones con almohadilla térmica. Se inyectaron por vía intramuscular 75 mg/kg de ketamina Ketaject y 5 mg/kg de xilazina Xylaject (Phoenix Pharmaceutical, Inc., St. Joseph, Missouri), como anestesia. Se practicó una disección cortante del tejido blando que recubre la tibia y la articulación de la rodilla. Con la pata en extensión, se lateralizó el ligamento rotuliano, a continuación, en la flexión, se preparó un agujero de acceso en la metáfisis proximal al interior del canal medular utilizando un taladro quirúrgico e irrigación con solución salina fisiológica. Se cortó una aguja de Kirschner de 0,7 mm a la longitud apropiada para adaptarse al tamaño de la tibia.  
30 La aguja de Kirschner se obtuvo de K-Medic (Northvale, NJ) Lote # K11262 y se utilizó para imitar el uso de un clavo intramedular en el tratamiento de una fractura de tibia humana.

35 A continuación, se preparó una osteotomía transversal en el tercio superior de la diáfisis tibial derecha con una sierra recíproca (manguito - 0,2 mm). En condiciones semiasépticas (por ejemplo, limpiando bien con alcohol la zona de operación), se logró una reducción de la fractura transversal utilizando la aguja de Kirschner, que se insertó a través del agujero de acceso hasta la parte distal de la tibia.

40 Se dividió a las ratas en cuatro grupos de ensayo para evaluar la consolidación de la fractura ósea de la siguiente manera:

Fractura sola (no tratado) – las ratas de este grupo no recibieron tratamiento, y se dejó consolidar la fractura producida por la osteotomía de forma natural.

45 Fractura + matriz (testigo) – las ratas de este grupo recibieron tratamiento con una composición de matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno y un tampón de acetato de sodio. La composición se preparó según lo dispuesto en el Ejemplo 1, haciendo el tampón de acetato de sodio las veces de sustituto de la solución de PDGF.

Fractura + matriz (baja concentración) – las ratas de este grupo recibieron tratamiento con una composición de matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno y solución de rhPDGF-BB. La composición se preparó según lo dispuesto en el Ejemplo 1, y la concentración de rhPDGF-BB en la solución fue de 0,3 mg/ml.

50 Fractura + matriz (alta concentración) – las ratas de este grupo recibieron tratamiento con una composición de matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno y solución de rhPDGF-BB. La composición se preparó según lo dispuesto en el Ejemplo 1, y la concentración de rhPDGF-BB en la solución fue de 1,0 mg/ml.

55 Para los tres grupos de ensayo que recibieron la matriz de  $\beta$ -TCP +/- la solución de PDGF, se colocaron 18 mm de longitud x 2 mm de anchura de material de matriz alrededor de la osteotomía transversal. Para el grupo "no tratado", no se aplicó ninguna matriz al sitio quirúrgico. Después del tratamiento, los tejidos blandos se cerraron en capas con suturas reabsorbibles de vicryl 4-0 mediante una aguja de corte CE4. Se dejó que soportaran peso sin protección, y los animales reanudaron la actividad normal después de las cirugías.

60 De los 80 animales del experimento, 6 animales fueron excluidos del análisis de datos, 2 debido a complicaciones en la fractura derivadas de una colocación inapropiada de la aguja de Kirschner, 2 debido a problemas técnicos con los ensayos biomecánicos, y 2 debido a la muerte después de la cirugía. Las dos muertes parecían ser el resultado de la intervención quirúrgica agresiva y los efectos de la anestesia. No se produjeron en el estudio muertes asociadas con ningún tratamiento.

65 Los animales se monitorizaron diariamente para detectar cualquier reacción adversa al material implantado, incluyendo: edema, enrojecimiento y pérdida de peso. Se realizó la evaluación en busca de signos de sufrimiento y

dolor que incluyen letargia, pelaje erizado, gemidos, muecas de dolor, retraso en el desarrollo (disminución de la actividad global o disminución de la alimentación), y/o actividad generalizada sobreexcitada. No hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos de tratamiento en cuanto a la pérdida o ganancia de peso.

- 5 Se dividió cada uno de los cuatro grupos de ensayo como se ha definido anteriormente en periodos temporales de 3 semanas y 5 semanas. Se asignaron las ratas en cada uno de los grupos de ensayo a un período de 3 semanas o a un periodo de 5 semanas. Los períodos de 3 y 5 semanas se corresponden con el intervalo de tiempo entre osteotomía/tratamiento y la recolección de tejido para evaluar la consolidación del hueso.
- 10 En el momento del sacrificio, ya sea 3 ó 5 semanas después de la cirugía, se sacrificaron las ratas de los cuatro grupos de ensayo utilizando CO<sub>2</sub>. Se recogieron las tibias, incluidas las tibias sanas contralaterales, se retiraron con delicadeza las agujas de Kirschner, y se radiografiaron las fracturas. Las tibias seleccionadas al azar para el análisis micro-TC se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%. Las muestras recogidas para el análisis micro-TC se procesaron siguiendo el análisis TC para la histología. El resto de las tibias recogidas (fracturadas y no fracturadas)
- 15 se envolvieron en gasa empapada en solución salina y se almacenaron a -20°C hasta que se realizó el análisis biomecánico de torsión. La Tabla 1 resume la preparación experimental proporcionada anteriormente.

Tabla 1 - Resumen de los tratamientos experimentales

<b>3 semanas</b>		
<b>Tratamientos</b>	R, B	MC/H
Fractura no tratada	8	2
Vehículo + tampón	8	2
PDGF 0,3 mg/ml	8	2
	8	
TOTAL + extra	40	
<b>5 semanas</b>		
<b>Tratamientos</b>	R, B	MC/H
Fractura no tratada	8	2
Vehículo + tampón	8	2
PDGF 0,3 mg/ml	8	2
PDGF 1,0 mg/ml	8	2
TOTAL + extra	40	
R = radiografías, B = ensayos biomecánicos MC = análisis micro-CT, H = análisis histológico		

40 Radiografía: Las radiografías se obtuvieron utilizando un Faxitron (modelo # 43855C, Wheeling, Illinois) ajustado a 28 kilovoltios, 0,3 miliamperios, plataforma 8, durante 9 segundos. Colocando las muestras en el mismo número de plataforma en la cámara de exposición, se obtuvo una distancia constante entre la fuente de rayos X y la película (muestra). La película utilizada fue Kodak X-Ornat AR (XAR)-5 Film (Kodak, Rochester, Nueva York).

45 Micro-CT: De los 10 animales de cada grupo de estudio, 2 se designaron previamente para el análisis micro-TC. Las muestras se exploraron en un escáner pCT 40 (Scanco Medical, Zurich, Suiza). Se utilizaron un campo de visión de 12,3 mm y un tamaño de matriz de 1024 x 1024, lo que dio como resultado una resolución de voxel isotrópico de 12 µm. Las imágenes se recogieron desde aproximadamente 28 mm de la tibia (de la epífisis a la unión tibioperonea). El tiempo de exploración resultante fue de aproximadamente 6 horas/muestra. Se binarizaron las imágenes en la escala de grises de 16 bits, utilizando un(os) valor(es) umbral adecuado(s), para la presentación y la visualización en 3D.

50 Ensayos biomecánicos de torsión: De los 10 animales de cada grupo de estudio, 8 se designaron previamente para la evaluación de los ensayos biomecánicos. Se midieron las propiedades mecánicas de la tibia fracturada en proceso de consolidación mediante un procedimiento de ensayo de torsión destructivo utilizando una máquina de ensayos SmartTest. Los huesos fracturados y los huesos no fracturada contralaterales se sacaron de los -20°C, y se descongelaron a temperatura ambiente durante 12 horas. Se humedecieron los huesos con solución salina antes de cargarlos en la plantilla. Se orientaron todos los huesos por igual en la máquina de ensayos. Se marcaron las epífisis distal y proximal de la tibia con una línea para indicar su colocación en la plantilla. Sólo la diáfisis de la tibia era visible una vez en la plantilla. Antes y durante los procedimientos de ensayo, las tibias se mantuvieron húmedas con solución salina.

55 Se aplicó un desplazamiento de rotación externa a una velocidad de 0,25 grados por segundo hasta producirse el fallo. Se registraron los datos del par y del desplazamiento en un ordenador compatible con IBM utilizando el software WinTest (Versión 2.56, BOSE-Enduratec Systems Group, Minnetonka, Minnesota). Se calcularon la rigidez

65

a la torsión, y el par máximo y el grado de angulación. El par máximo y la rigidez describen el comportamiento mecánico de los huesos fracturados e intactos.

5 Histología: De los 10 animales de cada grupo de estudio, 2 se designaron previamente para la evaluación histológica. Estos fueron los mismos dos animales dentro de cada grupo de ensayo que se evaluaron mediante análisis micro-TC. Para la evaluación histológica se utilizó el protocolo que se describe en la Tabla 2 para el procesamiento de los huesos fracturados. Se procesaron los tejidos mediante concentraciones crecientes de etanol (EtOH), se les perfundi metacrilato de metilo (MMA) y se embebieron utilizando técnicas conocidas para un experto habitual en la técnica. Los bloques embebidos se seccionaron, se montaron y se tiñeron. Los bloques embebidos se recortaron, y se recogieron secciones delgadas tomadas a lo largo de la dimensión larga del hueso fracturado. Las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con tricómico de Goldner. Se hicieron fotomicrografías a diversas potencias para facilitar el análisis histológico.

10 Análisis radiográfico: se hicieron radiografías para confirmar la ubicación de las fracturas y la reproducibilidad de la lesión entre los grupos. Debido a la presencia de  $\beta$ -TCP en el sitio de fractura, se descubrió que las radiografías tenían un valor limitado para analizar la consolidación de las fracturas.

15 Análisis histológico: Se proporcionan fotomicrografías representativas de los sitios de fractura para la semana 5 para cada uno de los cuatro grupos de tratamiento. La figura 1 muestra las fotomicrografías de un sitio de fractura del hueso no tratado en una rata con osteoporosis (no tratada). Como se muestra en las micrografías, la consolidación del hueso en el sitio no tratado no resultaba evidente a través de la osteotomía. El sitio de fractura se identifica mediante barras de color rojo. Como consecuencia del remodelado y la mínima formación de callo y la consolidación, los anchos de la osteotomía a través de las cortezas fueron desiguales. Había una matriz laxa de tejido fibroso mezclada con elementos de tejido de granulación e infiltrado inflamatorio moderado tal como se muestra en las Figuras 1(a) y (d). Los márgenes de la fractura de las Figuras 1(b)-(e) tenían una mínima o ninguna formación de callo. Sin embargo, hubo pruebas ocasionales de una respuesta condrogénica en los márgenes de la osteotomía tal como se muestra en las figuras 1(c) y (d).

20 La Figura 2 muestra fotomicrografías de los procesos de consolidación en un sitio de fractura ósea en una rata con osteoporosis tratada con matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno y tampón (testigo). La consolidación ósea y la formación de callo fueron escasas por la osteotomía y las zonas contiguas. Se alinearon los márgenes de la fractura (osteotomía) y se observó poca formación de callo perióstico y aparecía sobre todo en una corteza. Como se muestra en las figuras 2(a)-(c), el puente de callo tenía un pequeño espacio que podía haberse producido durante la preparación del corte histológico. Hubo pruebas de hemorragia sin formación de callo, como se muestra en la Figura 2(d). La médula ósea se reemplazó por tejido fibroso con infiltrado de células inflamatorias de moderado a notable.

25 La Figura 3 muestra fotomicrografías de los procesos de consolidación en un sitio de fractura ósea en una rata con osteoporosis tratada con una composición que comprende una solución de PDGF (0,3 mg/ml) y matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno (baja concentración). Como se muestra en las micrografías, existía formación de hueso laminar y tejido reticular a través de la fractura (osteotomía). También había callo formando puentes entre ambas cortezas y que se unía a través del canal medular, lo que indica la consolidación y remodelado óseo activa como se demuestra en las Figuras 3(a), (c) y (d). Hubo una cantidad mínima de tejido conectivo fibroide laxo e inflamación en el canal medular y a lo largo del clavo de inserción intramedular (IM). No hubo ni formación de hueso ectópico fuera de la envoltura perióstica (flechas curvas) ni fibrosis del tejido conectivo denso inapropiada en la zona de tratamiento.

30 La Figura 4 muestra fotomicrografías de los procesos de consolidación en un sitio de fractura ósea en una rata con osteoporosis tratada con una composición que comprende una solución de PDGF (1,0 mg/ml) y matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno (alta concentración). El nuevo hueso y remodelado quedó limitado y localizado al sitio de consolidación de la fractura, con formación de hueso laminar. Los márgenes de la fractura (osteotomía) estaban bien alineados. Las figuras 4(a) y (c) muestran una cantidad de callo en los márgenes corticales de moderada a notable con formación completa de puentes en la corteza inferior. Hubo ligera fibrosis del tejido conectivo laxo en el canal medular con infiltración inflamatoria mínima. En consonancia con las observaciones a baja concentración de PDGF, no hubo pruebas de formación de hueso ectópico fuera de la envoltura perióstica (flechas curvas) ni fibrosis del tejido conectivo denso indeseada en la zona de tratamiento.

35 Análisis micro-TC: Se llevó a cabo el análisis micro-TC (tomografía computarizada) en cada uno de los cuatro grupos de tratamiento en la semana 3 y en la semana 5. Los ejemplos representativos de los análisis micro-TC para cada uno de los cuatro grupos de tratamiento 5 semanas después de la lesión se presentan en la Figura 5. Los resultados de los análisis demostraron que había pruebas de restos de partículas de  $\beta$ -TCP alrededor de los sitios de fractura en la semana 3 y en la semana 5, aunque la cantidad presente a las 5 semanas se reducía a partir de la semana 3. En ninguno de los dos instantes de tiempo hubo pruebas de calcificación ectópica en los tejidos blandos. En general, la apariencia en la microCT de la consolidación de las fracturas tratadas con las concentraciones bajas y altas de PDGF reveló que el proceso de consolidación de la fractura ósea era normal y se limitaba al sitio de fractura.

40 Análisis de los ensayos biomecánicos: Se llevaron a cabo ensayos biomecánicos para medir la resistencia del sitio de fractura para los cuatro grupos de estudio, tanto en la semana 3 como en la semana 5. Se recogieron las patas

fracturadas y no fracturadas contralaterales de cada animal y se evaluaron ambas patas para determinar la resistencia biomecánica en un análisis de torsión. El análisis de torsión se llevó a cabo utilizando un SmartTest Servo Pneumatic Axial Torsional System, BOSE-EnduraTEC Systems Group, Minnetonka, MN con el software WinTest, versión 2.56.

5 El análisis de la pata contralateral no fracturada permitió la comparación directa de la resistencia de la pata entre las patas fracturadas y las no fracturadas, así como el establecimiento de una relación de la resistencia a la torsión entre la pata fracturada y la no fracturada. El uso de una relación de la resistencia de la pata en cada animal permitió que cada animal actuase como su propio control en el análisis de datos, reduciendo al mínimo las diferencias que  
10 pudieran existir entre los animales, tales como la edad, el tamaño o el efecto del procedimiento de ovariectomía.

En la Tabla 2 se presenta un resumen de los resultados de los ensayos biomecánicos para la resistencia a la torsión de la pata, para la pata fracturada y la pata contralateral no fracturada, para los cuatro grupos de tratamiento en los dos instantes de tiempo. La evaluación estadística de los datos presentados en la Tabla 2 se presenta en las Tablas 6-8. En las Tablas 3 y 4 se presenta un resumen de la resistencia a la torsión como una relación entre la pata  
15 fracturada y la no fracturada en cada animal, para los dos instantes de tiempo.

Tabla 2 - Comparación de los ensayos de resistencia biomecánica **Par cuando se produce el fallo (Nm)**

Grupo temporal (semanas)	Tratamiento	Dosis PDGF (mg/ml)	Pata fracturada	Pata no fracturada
3	Fractura sola (no tratada)	0	0,0565	0,1215
	Fractura + matriz (Testigo)	0	0,0505	0,1176
	Fractura + matriz/ PDGF a dosis baja (baja concentración)	0,3	0,0395	0,1026
	Fractura + matriz/ PDGF a dosis alta (alta concentración)	1,0	0,0475	0,1207
5	Fractura sola (no tratada)	0	0,0555	0,1152
	Fractura + matriz (Testigo)	0	0,0652	0,1048
	Fractura + matriz/ PDGF a dosis baja (baja concentración)	0,3	0,0862	0,1117
	Fractura + matriz/ PDGF a dosis alta (alta concentración)	1,0	0,0854	0,1153

Tabla 3 - Resumen de los ensayos biomecánicos para los 4 grupos de estudio a las 3 semanas

	Frx. sola	Frx. + matriz	Frx. + Baja	Frx. + Alta
Relación de la resistencia				
N	6	8	8	7
Media*	0,51	0,45	0,38	0,38
Mediana*	0,41	0,52	0,30	0,47
Desviación Estándar	0,32	0,31	0,23	0,27
Min-Max	0,22-1,08	0-0,81	0,18-0,81	0-0,64
* Los datos se presentan como la relación de la resistencia a la torsión entre la pata fracturada y la pata contralateral no fracturada. La relación se calculó para cada animal individualmente y, a continuación, se agruparon para obtener un valor medio. Una relación de 1,0 indicaría que la pata fracturada tiene la misma resistencia a la torsión que la pata no fracturada.				

Tabla 4 - Resumen de los ensayos biomecánicos de los 4 grupos de estudio a las 5 semanas

	Frx. sola	Frx. + matriz	Frx. + Baja	Frx. + Alta
Relación de la resistencia				
N	7	8	7	7
Media*	0,49	0,66	0,79	0,74
Mediana*	0,44	0,58	0,83	0,93
Desviación Estándar	0,38	0,42	0,37	0,38
Min-Max	0-1,19	0-1,45	0,20-1,19	0-1,06
* Los datos se presentan como la relación de la resistencia a la torsión entre la pata fracturada y la pata contralateral no fracturada. La relación se calculó para cada animal individualmente y, a continuación, se agruparon para obtener un valor medio. Una relación de 1,0 indicaría que la pata fracturada tiene la misma resistencia a la torsión que la pata no fracturada.				

Se midió la evaluación del efecto del tiempo sobre la relación de la resistencia a la torsión entre la pata fracturada y la pata no fracturada y se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 5. En la Tabla 5 se demuestra que para el grupo no tratado no hubo diferencia significativa en la relación observada entre la semana 3 y la semana 5. Del mismo modo, para los animales tratados con la matriz de  $\beta$ -TCP (grupo testigo) no hubo diferencia significativa en la relación de la resistencia a la torsión entre la semana 3 y la semana 5.

Tabla 5: Evaluación del efecto del tiempo para los cuatro grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	Relación media en la semana 3	Relación media en la semana 5	Valor P de una cola*
No tratado	0,51	0,49	0,4560
Testigo	0,45	0,66	0,1381
Baja concentración	0,38	0,79	0,0106
Alta concentración	0,38	0,74	0,0296

\*El valor P es el resultado de una prueba de la t de Student para dos muestras que compara la relación media de la medición de la resistencia entre la pata fracturada y la pata no fracturada para cada grupo de tratamiento entre los instantes de tiempo semana 3 y semana 5.

Por el contrario, para los animales tratados con el  $\beta$ -TCP combinado con cualquiera de las concentraciones alta o baja de rhPDGF-BB, hubo un aumento estadísticamente significativo de la relación de la resistencia a la torsión en la semana 5, en comparación con la semana 3 (Tabla 5). Cuando se agruparon los animales tratados con rhPDGF-BB a concentraciones alta y a concentración baja, el efecto del tiempo se vuelve aún más significativo, duplicándose la relación de la resistencia a la torsión desde un valor de 0,38 a 0,77, lo que proporciona un valor de p muy significativo, 0,0010. Estos datos demuestran que el tratamiento con rhPDGF-BB conducía a un aumento dependiente del tiempo de la resistencia del sitio de fractura en comparación con los dos grupos testigo evaluados en el estudio.

Se analizaron adicionalmente los datos para evaluar las mediciones de la resistencia a la torsión directa entre la pata fracturada y la pata contralateral no lesionada dentro de cada grupo, y tanto en la semana 3 como en la semana 5. Los datos para la semana 3, que se presentan en la Tabla 6, demuestran que para los cuatro grupos de ensayo, la medición de la resistencia a la torsión biomecánica es estadísticamente diferente entre la pata fracturada y la pata contralateral no fracturada. El análisis de la semana 5 (Tabla 7) demostró que para el grupo no tratado y el grupo con matriz de  $\beta$ -TCP, también había una diferencia significativa de la resistencia de la patas fracturada y no fracturada, similar a lo que se observó en la semana 3. Por el contrario, había tenido lugar una reparación suficiente de las fracturas tanto para los grupos con concentración de rhPDGF-BB "baja" y "alta", de manera que ya no existía una diferencia estadísticamente significativa de la resistencia de las patas fracturada y no fracturada.

Tabla 6: Comparación de la pata lesionada con la pata no lesionada a las 3 semanas para los cuatro grupos de tratamiento.

Grupo de tratamiento	Resistencia media de la pata lesionada	Resistencia media de la pata no lesionada	Valor P de dos colas*
No tratado	0,06	0,12	0,0333
Testigo	0,05	0,12	0,0035
PDGF (Baja concentración)	0,04	0,10	0,0003
PDGF (Alta concentración)	0,05	0,12	0,0010

\* El valor P es el resultados una prueba de la t de Student pareada que compara los valores de la resistencia media (par cuando se produce el fallo (Nm)) entre la pata lesionada y la pata no lesionada para cada uno de los cuatro grupos de tratamiento en la semana 3.

Tabla 7: Comparación de la pata lesionada con la pata no lesionada a las 5 semanas para los cuatro grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	Resistencia media de la pata lesionada	Resistencia media de la pata no lesionada	Valor P de dos colas*
No tratado	0,05	0,11	0,0179
Testigo	0,06	0,10	0,0378
PDGF (Baja concentración)	0,09	0,11	0,1649
PDGF (Alta concentración)	0,08	0,11	0,1117

\* El valor P es el resultados una prueba de la t de Student pareada que compara los valores de la resistencia media (par cuando se produce el fallo (Nm)) entre la pata lesionada y la pata no lesionada para cada uno de los cuatro grupos de tratamiento en la semana 5.

Para evaluar el efecto de la dosis entre las concentraciones de rhPDGF-BB "baja" y "alta", se determinó la diferencia entre la resistencia de la pata lesionada y la resistencia de la pata no lesionada para cada grupo de ensayo con PDGF para la semana 5. Los datos, que se presentan en la Tabla 8, demuestran que no había diferencia significativa entre los dos grupos, lo que demuestra que no hay un efecto significativo de la concentración entre los regímenes de dosificación "baja" y "alta".

Tabla 8: Comparación de los grupos de tratamiento con PDGF a las 5 semanas

Diferencia media de Frx + baja	Diferencia media de Frx + alta	Valor P de dos colas*
-0,028	-0,026	0,9166

Comentario: El criterio de valoración del análisis es la diferencia entre la resistencia de la pata lesionada (par cuando se produce el fallo (Nm)) y la resistencia de la pata no lesionada. La diferencia se calculó para cada animal individual dentro de un grupo de ensayo, y a continuación, se obtuvo el valor medio, como se presenta en la tabla. \* El valor P es el resultado de una prueba de la t de Student para dos muestras.

Como demuestran los resultados del estudio, una composición que comprende una solución de PDGF dispuesta en una matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno puede potenciar la reparación de fracturas óseas. A las 5 semanas, las patas fracturadas de ratas con osteoporosis de los grupos no tratado y testigo en comparación con las patas contralaterales no fracturadas para cada animal, eran significativamente más débiles que las patas fracturadas de las ratas con osteoporosis de los grupos con concentración de rhPDGF-BB alta y baja en comparación con las patas contralaterales no fracturadas para cada animal. Por otra parte, disponer concentraciones "alta" y "baja" de soluciones de PDGF en una matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno produjo un aumento de la relación de la resistencia entre las patas fracturadas y las patas contralaterales no fracturadas en la semana 5 en comparación con la de la semana 3, lo que demuestra un efecto consolidativo dependiente del tiempo. Por el contrario, no se observó un aumento en la resistencia a la fractura entre la de la semana 3 y la de la semana 5 para los grupos no tratado y testigo. Además, la dosis de 0,3 mg/ml de rhPDGF-BB fue al menos tan eficaz como la dosis de 1,0 mg/ml de rhPDGF-BB cuando se dispuso en una matriz de  $\beta$ -TCP/colágeno para potenciar la reparación ósea.

Los resultados biomecánicos del estudio demuestran que el tratamiento con PDGF administrado a nivel local da como resultado un aumento dependiente del tiempo estadísticamente significativo de la resistencia a la torsión en el sitio de fractura al que se aplica la composición de implante. Estas conclusiones contrastan con los resultados obtenidos para los dos grupos testigo diferentes de animales a los que no se administró la composición de PDGF y en los que no se observó un aumento de la resistencia del sitio de fractura. Estos resultados demuestran la eficacia del PDGF para potenciar la reparación de fracturas en un modelo animal pertinente, y confirman el beneficio del uso de PDGF para estimular la reparación de fracturas en un entorno clínico.

Los resultados histológicos y radiográficos también revelan que la administración de PDGF al hueso deteriorado de las ratas no produce remodelado óseo inconveniente, no genera formación de hueso ectópico y no produce ninguna respuesta fibrótica anormal.

### EJEMPLO 3

#### *Consolidación de fracturas de los huesos largos*

Las composiciones de PDGF de la presente invención se utilizan para facilitar la consolidación de fracturas de los huesos largos y también de fracturas del tobillo y de la pata. Los huesos largos a tratar incluyen, pero no se limitan al



húmero, cúbito, radio, fémur, tibia y peroné. Aunque en este ejemplo se describe el fémur, debe entenderse que pueden tratarse de manera similar otros huesos largos.

5 Algunas fracturas del fémur se estabilizan insertando clavos intramedulares, mediante técnicas conocidas para un experto en la materia de la cirugía ortopédica. Las composiciones de PDGF de la presente invención pueden aplicarse al canal medular antes o durante la colocación del clavo intramedular. Estas composiciones de PDGF pueden aplicarse a través de un tubo insertado en el canal medular, y si el canal debe ser escariado para aceptar correctamente el clavo intramedular, la composición puede aplicarse después de finalizado el escariado y antes de la inserción del clavo.

10 Como alternativa, el clavo intramedular puede recubrirse con las composiciones de PDGF de la presente invención y a continuación, insertarse en el canal. Como alternativa, las composiciones de PDGF se aplican a los agujeros taladrados en el hueso para recibir el tornillo.

15 Las composiciones de PDGF de la presente invención también pueden aplicarse a los tornillos que atraviesan el hueso cortical cerca de la cabeza femoral y también a los tornillos que atraviesan el hueso cortical en el fémur distal para facilitar la formación de hueso en estos sitios. El material ortopédico, tal como clavos y tornillos y otros instrumentos para realizar este procedimiento están disponibles en el mercado de proveedores tales como Smith & Nephew, Memphis, TN.

20 EJEMPLO 4

*Preparación de una composición que comprende una solución de PDGF y una matriz biocompatible*

25 Se preparó una composición que comprende una solución de PDGF y una matriz biocompatible según el siguiente procedimiento.

30 Se obtuvo un bloque previamente pesado de matriz biocompatible que comprendía partículas de  $\beta$ -TCP. El  $\beta$ -TCP comprendía partículas puras de  $\beta$ -TCP con un diámetro medio que iba de aproximadamente 75  $\mu$ m hasta aproximadamente 300  $\mu$ m. Puede obtenerse una matriz biocompatible de  $\beta$ -TCP en el mercado de Kensey Nash (Exton, Pensilvania).

35 Se obtuvo una solución que comprendía rhPDGF-BB. El rhPDGF-BB están disponible en el mercado en Chiron Corporation, a una concentración de solución madre de 10 mg/ml (es decir, Lote # QA2217) en un tampón de acetato de sodio. El rhPDGF-BB es producido en un sistema de expresión en levaduras por Chiron Corporation y procede de la misma planta de producción que el rhPDGF-BB que se utiliza en los productos REGRANEX, (Johnson & Johnson, New Brunswick, NJ) y GEM 21S (BioMimetic Therapeutics, Franklin, TN), que ha sido autorizado para su uso humano por la Food and Drug Administration. Este rhPDGF-BB también está autorizado para su uso humano en la Unión Europea y Canadá. Se diluyó la solución de rhPDGF-BB a una concentración de 0,3 mg/ml en el tampón de acetato. La solución de rhPDGF-BB puede diluirse a cualquier concentración deseada según formas de realización de la presente invención, incluida 1,0 mg/ml.

40 Se utilizó una relación de aproximadamente 91  $\mu$ l de solución de rhPDGF-BB y aproximadamente 100 mg en peso seco de la matriz biocompatible de  $\beta$ -TCP para producir la composición. La solución de rhPDGF-BB se expulsó en la matriz biocompatible con una jeringa.

45 EJEMPLO 5

*Método de tratamiento de una fractura del radio distal*

50 Diseño experimental y visión de conjunto

55 Se realizó este estudio multicéntrico para evaluar las características de manejo y la utilidad clínica (es decir, el rendimiento, los parámetros radiográficos) del  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB para el tratamiento de las fracturas del radio distal inestables que requieren reducción abierta y fijación externa (RAFE) o fijación interna (RAFI) con placa volar.

60 Se evaluó a los sujetos que experimentaron una fractura inestable primaria que se redujo inicialmente de manera urgente y pérdida de la reducción, para su admisión en el estudio. Se realizó a cada sujeto un examen físico que incorporaba la historia clínica y la etiología de la fractura.

65 Se redujo la fractura del radio distal (DR) del sujeto durante la intervención y se volvió a clasificar para determinar si la morfología de la fractura estaba en consonancia con la clasificación preoperatoria de la fractura. Si la clasificación intraoperatoria era diferente de la clasificación preoperatoria, se anotaba en el cuaderno de recogida de datos intraoperatorios (CRD). El sujeto no se admitía en el estudio si el cirujano determinaba durante la intervención que la fractura no cumplía con los criterios de admisión de fracturas o la fractura no podía reducirse y estabilizarse adecuadamente según el protocolo. Los grupos de tratamiento del estudio fueron los siguientes:

Grupo I (Experimental): RAFE o RAFI (placa volar) con injerto óseo de  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB (0,3 mg/ml)  
 Grupo II (testigo): RAFE o RAFI (placa volar) sin material de injerto

5 Diecinueve (19) sujetos participaron en el estudio, 10 en el grupo I y 9 en el Grupo II. La edad media de los sujetos era de 65 años y todos eran mujeres.

10 Se inmovilizó a todos los sujetos después de la intervención con un fijador externo convencional o placa volar, según la atención médica normal. Se retiró el fijador externo o molde de fibra de vidrio a criterio del investigador en base a la evaluación de la consolidación de la fractura (se recomienda entre 3 y 8 semanas después de la intervención), y se registró la fecha de retirada de la inmovilización. El sujeto fue examinado por el cirujano y el fisioterapeuta colegiado a los 7-14 días, 3, 4, 5, y 9 semanas, y a los 3 y 6 meses para la tomografía computarizada, radiológica y clínica (TC; como requiere el protocolo), y las evaluaciones funcionales, así como las complicaciones y/o las reacciones adversas relacionadas con los dispositivos. El investigador puede haber solicitado una evaluación de los sujetos durante un máximo de 24 meses después de la intervención para el seguimiento de los avances. Se analizó la continuación del seguimiento con los sujetos durante los seis meses de la visita de seguimiento, y el investigador recogió los datos apropiados y los presentó al patrocinador. Se registró el uso de la medicación prescrita y sin receta médica. Cada sujeto relleno un formulario de evaluación de la calidad de vida relacionada con la discapacidad de brazo, hombro y mano (DASH), que evalúa la capacidad de un sujeto para realizar las funciones motoras gruesas y finas además de otras actividades.

25 Las evaluaciones clínicas y funcionales consistieron en una evaluación de la mano, que implicaba una comparación de la extremidad del sujeto no afectada (normal) con la extremidad afectada. Se realizaron tres mediciones consecutivas de la fuerza de agarre con un dinamómetro Jamar, con el mismo ajuste para el agarre (se recomienda el 2º escalón) y se registraron. Se midió el grado de movilidad (ROM) que consistía en pronación, supinación, flexión y extensión, y desviación radial/cubital medidas con un goniómetro. El programa de seguimiento se anotó en el resumen del cronograma del estudio que se presenta más adelante (Tabla 10) y todos los sitios intentaron mantener las visitas de los sujetos dentro de los intervalos de visita recomendados. Sin embargo, algunos sujetos no pudieron cumplir todos los intervalos de visita del estudio debido a conflictos de programación relacionados con los días de consulta del investigador, la terapia física y/o las visitas a radiología. El patrocinador y/o el investigador pudieron haber solicitado evaluar a los sujetos hasta 24 meses después de la intervención, y se informó a los sujetos después de su visita de los seis meses.

35 El cirujano realizó evaluaciones radiográficas (como exige el protocolo) para monitorizar la consolidación de las fracturas. Un(os) especialista(s) en radiología musculoesquelética designado(s) realizaron una evaluación de TC y radiográfica independiente y evaluaron parámetros radiográficos para la consolidación. Estas mediciones de la consolidación de fracturas fueron documentadas en el CRD y fueron analizadas para determinar la consolidación de fracturas por un especialista en radiología musculoesquelética independiente según el plan de análisis estadístico.

40 Todas las complicaciones postoperatorias y las reacciones adversas relacionadas con los dispositivos se registraron en el CRD apropiado. Si un sujeto requería una nueva reducción u otro procedimiento quirúrgico por una reacción adversa grave o si se retiraba el dispositivo, se continuaba la monitorización del sujeto por razones de seguridad hasta el final del estudio. Todos los sujetos fueron monitorizados durante el experimento de seis meses y se solicitó a cualquier sujeto que solicitase abandonar el estudio o que lo abandonase a solicitud del investigador que proporcionase una razón para la interrupción del estudio.

Tabla 9 – Resumen del cronograma del estudio

50	Visita 1 Visita de cribado	Visita 2 Visita quirúrgica	Visita 3 Segui- miento Post Tx	Visita 4 Segui- miento Post Tx	Visita 5 Segui- miento Post Tx	Visita 6 Segui- miento Post Tx	Visita 7 Segui- miento Post Tx	Visita 8 Segui- miento Post Tx	Visita 9 Segui- miento Post Tx
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
55	A los 12 días de la fractura	A los 12 días de la fractura Día 0	Día 7-14	Semana 3 ±3 días	Semana 4 ±3 días	Semana 5 ±3 días	Semana 9 ±7 días	Semana 12 ±14 días	Semana 24 ±14 días

60 El criterio principal de valoración del estudio fue la fuerza de agarre medida como un porcentaje con respecto al brazo contralateral. Los criterios de valoración radiográficos semicuantitativos secundarios incluían la evaluación de la consolidación de la fractura incluida la formación de callo (primaria y secundaria), la presencia de espacios de fractura entre los fragmentos, callo de consolidación en la corteza periférica, callo de consolidación que forma un puente con el hueso subcondral, presencia de formación de hueso heterotópico, y una evaluación general del nuevo

- relleno óseo dentro de los espacios de fractura (% de relleno óseo). Las mediciones cuantitativas secundarias incluían acortamiento radial axial, ángulo radial, ángulo dorsal, incongruencia articular radioulnar distal e incongruencia radiocarpiana. Por otra parte, los criterios de valoración funcionales clínicos secundarios comprendían el tiempo hasta la retirada del molde de fibra de vidrio, prueba del monofilamento de Semmes-Weinstein, edema, dolor, evaluación de la calidad de vida (DASH), y grado de movilidad incluida la pronación, supinación, flexión, extensión y desviación radial/cubital.
- Protocolo quirúrgico: Una vez admitidos los sujetos en el estudio, que satisfacían los criterios de inclusión y de exclusión, se llevó a cabo el siguiente protocolo quirúrgico. *Reducción abierta y fijación externa*. Antes de la cirugía, se obtuvieron radiografías convencionales simples PA, lateral y oblicua (45°) de las muñecas afectadas y no afectadas. Las fracturas se clasificaron utilizando los sistemas AO y Frykman de fractura del radio distal. Antes del tratamiento, se obtuvieron radiografías lateral y PA simple de la muñeca opuesta.
- Se llevó a los pacientes a quirófano (OR) de manera convencional para tratar las fracturas del radio distal con reducción abierta y fijación externa previa verificación de haberse alcanzado todos los criterios de inclusión/exclusión.
- Se administró a todos los pacientes anestesia preoperatoria adecuada, siendo administrada la anestesia regional o anestesia general por el cirujano de la mano o un cirujano plástico y/o un anestesista. Todos los pacientes recibieron antibióticos preoperatorios por vía intravenosa según procedimientos convencionales.
- Se preparó y cubrió la zona quirúrgica de la extremidad afectada de manera convencional habitual. Se exanguinó el brazo y se utilizó un control de torniquete para la cirugía. Se llevó a cabo un abordaje RAFE convencional hasta el radio distal. Se realizó una pequeña incisión dorsal que permitía el acceso al sitio de fractura según los procedimientos convencionales de injerto óseo asociados con la fijación externa.
- El fijador externo se colocó según los procedimientos convencionales antes de la reducción. El fijador externo se bloqueó en una posición de la fractura adecuada según los procedimientos convencionales de fijación externa.
- Bajo visualización directa, se redujeron los fragmentos de la fractura de forma manual o con agujas de Kirschner para joysticks. Se llevó a cabo la fijación provisional. Se obtuvieron radiografías intraoperatorias para determinar la idoneidad de la reducción (los fluoroscans fueron aceptables). En caso adecuado, se colocó un fijador externo disponible en el mercado utilizando los procedimientos de fijación quirúrgica convencionales. En caso de no obtenerse la reducción y la estabilización adecuadas utilizando un fijador externo, se utilizaron clavos adicionales (agujas de Kirschner) para conseguir una reducción adecuada. Si no podía reducirse la fractura con la instrumentación de fijación adicional (tal como placas) el paciente quedaba excluido del estudio. En tales casos, estos sujetos se definieron como errores de cribado y no fueron admitidos en el estudio, ya que no había sido implantado el dispositivo de estudio.
- Una vez verificado que el paciente cumplía con todos los criterios del estudio, se seleccionó el sobre de aleatorización y se documentó y administró el tratamiento apropiado (Grupo I y Grupo II).
- Verificación de la reducción: se realizaron seriografías intraoperatorias, a criterio del cirujano, para determinar la idoneidad de la reducción. Se realizaron intentos para reducir la fractura a la inclinación volar original (en relación con el lado contralateral); sin embargo, se consideró aceptable la restauración de la inclinación volar a una posición neutra. La evaluación de las radiografías intraoperatorias se limitó a la evaluación de la adecuación de la reducción y no fueron vistas por el radiólogo para determinar los resultados cuantitativos o semicuantitativos.
- Después de la fijación y la reducción, se irrigó la herida antes del implante y se mezcló el  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB según el Ejemplo I y se metió manualmente en el espacio de fractura antes de la reducción final o después de la reducción, ya que quedaron espacios o huecos tras la reducción y la irrigación. Para los fines de este estudio, se definió como relleno adecuado rellenar el espacio de fractura que se extiende hasta, pero no más allá de, los márgenes de la fractura y su defecto.
- El material de injerto de  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB se implantó según los procedimientos convencionales de injerto óseo. El material se implantó antes de, durante, o después de la reducción y la fijación externa a criterio del investigador en base a la técnica de estabilización asociada con la fractura.
- Se construyó el injerto para que rellenase los espacios de las fracturas conminutas por medio de la interdigitación dentro del hueso esponjoso conminuto, dorsal, distal y proximalmente. El grado de relleno requerido variaba desde menos de 2 mm hasta tanto como 2 cm, dependiendo de la cantidad de hueso afectado.
- Se tuvo cuidado para asegurar que las partículas de injerto hidratadas no migrasen a los espacios articulares. Las partículas residuales se retiraron cuidadosamente de los tejidos blandos circundantes antes del cierre. El sitio quirúrgico no se irrigó después de la colocación del material de injerto.

- Una vez mezclados los materiales de implante, el médico esperó 10 minutos antes de implantarlos. A veces, el producto mezclado se humedecía con el rhPDGF-BB restante. Para cada mezcla se utilizó un nuevo dispositivo de mezcla estéril (espátula). El investigador ordenó al asistente que realizaba la mezcla que registrase la cantidad acumulada de  $\beta$ -TCP implantado que contenía PDGF, así como la cantidad residual de  $\beta$ -TCP no implantado. Se calculó la cantidad de  $\beta$ -TCP y se documentó mediante mediciones relativas cualitativas (1/3, 2/3, Toda). Se colocó el  $\beta$ -TCP residual en una copa graduada para registrar el volumen residual de  $\beta$ -TCP, que se utilizó para determinar un volumen exacto del  $\beta$ -TCP implantado.
- Después de finalizar la RAFE y el implante del material de injerto y el cierre de la herida, se obtuvieron radiografías postoperatorias de la superficie articular en 30 grados, oblicua, lateral y AP del sitio de fractura antes de finalizar la cirugía según el procedimiento convencional.
- Reducción abierta y fijación interna con placa volar - Procedimiento quirúrgico alternativo:*
- se obtuvieron radiografías convencionales simples PA, laterales y oblicuas (45 °) de las muñecas afectadas y no afectadas antes de la cirugía. Las fracturas se clasificaron utilizando los sistemas AO de fractura del radio distal. También se obtuvieron radiografías laterales y PA simples de la muñeca opuesta, antes del tratamiento.
- Se llevó a los pacientes a quirófano (OR) para tratar las fracturas del radio distal con reducción abierta y fijación interna previa verificación de haberse alcanzado todos los criterios de inclusión/exclusión.
- Se administró a todos los pacientes anestesia preoperatoria adecuada, siendo administrada la anestesia regional o anestesia general por el cirujano de la mano o un cirujano plástico y/o un anestesista. Todos los pacientes recibieron antibióticos preoperatorios por vía intravenosa según procedimientos convencionales.
- Se preparó y cubrió la zona quirúrgica de la extremidad afectada de manera convencional habitual. Se exanguinó el brazo y se utilizó un control de torniquete para la cirugía. Se llevó a cabo un abordaje anterior convencional hasta el radio distal. Todos los tendones flexores y las estructuras neurovasculares, incluido el nervio mediano, se protegieron durante la cirugía. Se retrajo y/o elevó el flexor largo del pulgar y se separó el músculo pronador redondo de la porción anterior del radio distal. En base a la cantidad de desplazamiento y/o conminución, se empleó un abordaje de la fractura extensa del radio distal que incluía la liberación del braquiorradial.
- Bajo visualización directa, se redujeron los fragmentos de la fractura de forma manual o con agujas de Kirschner para joysticks. Se llevó a cabo la fijación provisional. Se obtuvieron radiografías intraoperatorias para determinar la idoneidad de la reducción (los fluoroscans fueron aceptables). En caso adecuado, se colocó una placa volar disponible en el mercado utilizando los procedimientos convencionales de colocación quirúrgica de la placa. En caso de no obtenerse la reducción y la estabilización adecuadas utilizando una placa volar, se utilizaron clavos adicionales (agujas de Kirschner) para conseguir una reducción adecuada. Si no podía reducirse la fractura con la instrumentación de fijación adicional (tal como placas dorsales) el paciente quedaba excluido del estudio.
- Una vez verificado que el paciente cumplía con todos los criterios del estudio, se seleccionó el sobre de aleatorización y se documentó y administró el tratamiento adecuado (tratamiento o testigo).
- Verificación de la reducción: se realizaron seriografías intraoperatorias, a criterio del cirujano, para determinar la idoneidad de la reducción. Se realizaron intentos para reducir la fractura a la inclinación volar original (en relación con el lado contralateral); sin embargo, se consideró aceptable la restauración de la inclinación volar a una posición neutra. La evaluación de las radiografías intraoperatorias se limitó a la evaluación de la adecuación de la reducción y no fueron vistas por el radiólogo para determinar los resultados cuantitativos o semicuantitativos.
- RAFI con placa volar +  $\beta$ -TCP/rhPDGF-BB: En el Grupo I, se redujo la y se fijó la placa volar de manera idéntica a la indicada anteriormente. Después de la fijación, se irrigó la herida antes del implante, y se mezcló el material de  $\beta$ -TCP/rhPDGF-BB según el Ejemplo I y se metió manualmente en el espacio de fractura antes de la reducción final o después de la reducción, ya que quedaron espacios o huecos después de la reducción y la irrigación. Para los fines de este estudio, se definió como relleno adecuado rellenar el espacio de fractura que se extiende hasta, pero no más allá de, los márgenes de la fractura y su defecto.
- Se implantó el material de injerto de  $\beta$ -TCP/rhPDGF-BB según los procedimientos convencionales de injerto óseo. El material se implantó antes de, durante, o después de la reducción y la fijación interna a criterio del investigador en base a la técnica de estabilización asociada con la fractura.
- Se mezcló el injerto para rellenar los espacios de las fracturas conminutas por medio de interdigitación dentro del hueso esponjoso conminuto, dorsal, distal y proximalmente. El volumen de relleno requerido varió de menos de 2 mm hasta tanto como 2 cm, dependiendo del tamaño del hueco óseo.

Se tuvo cuidado de asegurar que el material de injerto de  $\beta$ -TCP/rhPDGF-BB no migrase a los espacios articulares. Se retiró cuidadosamente el material de injerto residual del tejido blando circundante antes del cierre. El sitio quirúrgico no se irrigó después de la colocación del material de injerto de  $\beta$ -TCP/rhPDGF-BB.

5 Una vez mezclados los materiales de implante, el médico esperó 10 minutos antes de implantarlos. A veces, el producto mezclado se humedecía con el rhPDGF-BB restante. Para cada mezcla se utilizó un nuevo dispositivo de mezcla estéril (espátula). El investigador ordenó al asistente que realizaba la mezcla que registrase la cantidad acumulada de material de injerto implantado, así como la cantidad residual de material de injerto no implantado. Se calculó la cantidad de material de injerto y se documentó mediante mediciones relativas cualitativas (1/3, 2/3, Todo).  
10 Se colocó el material de injerto residual en una copa graduada para registrar el volumen residual de material de injerto, que se utilizó para determinar un volumen exacto de material de injerto implantado.

Después de finalizar la RAFI y la administración del material de  $\beta$ -TCP/rhPDGF-BB y el cierre de la herida, se obtuvieron radiografías postoperatorias de la superficie articular en 30 grados, oblicua, lateral y AP del sitio de  
15 fractura antes de colocar una férula según el procedimiento convencional. Se recogieron los datos de resultados de este estudio sobre los resultados procedentes de las radiografías, las TC y del examen directo de la función de la extremidad. La frecuencia de estas mediciones se ilustra en la Tabla 10.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 10 - Frecuencia de las evaluaciones radiológicas y funcionales

Evento	Parámetros radiográficos			Evaluaciones funcionales				
	Parámetros radiográficos cuantitativos	Parámetros radiográficos semicuantitativos	Verificación de la reducción	Grado de movilidad	Fuerza de agarre	Dolor	DASH	
Gestión preoperatoria de la fractura	Antes del tratamiento	X						
	Después de la reducción de la fractura			X				
	Durante el implante			X				
	Después de la Reducción/Implante antes de la fijación			X				
	Inmediatamente después de la fijación	X			X	X	X	
	Día 7-14	X			X	X	X	
	Semana 3	X			X	X	X	
	Semana 4	X			X	X	X	
	Semana 5	X			X	X	X	
	Semana 9	X±			X	X	X	
Gestión de la extremidad lesionada	Semana 12	X			X	X	X	
	Semana 24	X			X	X	X	

Los resultados del estudio indicaban que el tratamiento de las fracturas del radio distal con las composiciones de la presente invención que comprendían una solución de PDGF dispuesta en una matriz de  $\beta$ -TCP aceleraba la consolidación al tiempo que conducía a mayores fuerzas de agarre a la semana 24 del estudio. En la Tabla 11 se proporciona una comparación de las fuerzas de agarre entre los sujetos del Grupo I y del Grupo II en diversos instantes de tiempo del estudio.

Tabla 11 - Fuerza de agarre (% de la contralateral)

Instante de tiempo	Grupo I	Grupo II
Semana 6	13	13
Semana 12	41	44
Semana 24	66	62

Por otra parte, la Tabla 12 muestra una comparación del nuevo relleno óseo dentro de los espacios de fractura del radio distal entre los sujetos del Grupo I y del Grupo II en función del tiempo.

Tabla 12 - Evaluación de nuevo relleno óseo dentro de los espacios de fractura

Instante de tiempo	> 50% de nuevo relleno óseo dentro de fractura	
	Grupo I	Grupo II
Semana 1	0/7 (0%)	0/9 (0%)
Semana 3	4/9 (44%)	1/9 (11%)
Semana 6	9/9 (100%)	5/9 (56%)
Semana 12	9/9 (100%)	8/9 (89%)
Semana 24	9/9 (100%)	8/9 (89%)

A partir de los resultados proporcionados en la Tabla 12, cada sujeto de Grupo I consiguió más de un 50% de nuevo relleno óseo dentro del espacio de fractura del radio distal en sustancialmente menos tiempo que los sujetos del Grupo II. La consolidación acelerada en los sujetos del Grupo I es alentadora para los pacientes comprometidos, incluidas las personas de edad avanzada, los fumadores, los bebedores, los diabéticos, los pacientes con problemas circulatorios, y los pacientes que padecen enfermedades óseas tal como la osteoporosis.

Además, en la Tabla 13 se proporciona una comparación de las fracturas clínicamente consolidadas entre los Grupos I y II.

Tabla 13 – Evaluación de las fracturas clínicamente consolidadas

Instante de tiempo	Fracturas clínicamente consolidadas	
	Grupo I	Grupo II
Semana 6	9/10 (90%)	9/9 (100%)
Semana 12	9/10 (90%)	8/9 (89%)
Semana 24	10/10 (100%)	9/9 (100%)

Como se proporciona en la Tabla 13, se determinó que cada fractura tratada con una composición de la presente invención estaba clínicamente consolidada.

Los resultados del estudio indicaban adicionalmente que la aplicación de las composiciones de la presente invención a las fracturas del radio distal no daba como resultado la formación de hueso ectópico o inflamación sustancial de la zona quirúrgica.

EJEMPLO 6

*Método de inhibición de las fracturas vertebrales secundarias por compresión*

Diseño experimental y visión de conjunto

Este ensayo clínico prospectivo, aleatorizado, controlado y realizado en un solo centro, evalúa la eficacia de las composiciones que comprenden una solución de PDGF dispuesta en una matriz de fosfato tricálcico para inhibir las fracturas secundarias por compresión en cuerpos vertebrales en alto riesgo (HVB) en el momento de la cifoplastia de las fracturas vertebrales por compresión. Se realizan comparaciones entre la composición testigo ( $\beta$ -fosfato tricálcico + tampón de acetato de sodio solo) y la composición experimental ( $\beta$ -fosfato tricálcico + rhPDGF-BB en

acetato de sodio). Por lo tanto, el presente estudio es un ensayo clínico piloto para apoyar el estudio demostrativo preliminar de que el  $\beta$ -TCP + rh-PDGF-BB previene o disminuye la probabilidad de fracturas vertebrales secundarias por compresión al aumentar la formación de hueso en los HVB.

5 El estudio se realiza en hasta un total de 10 sujetos que requieren tratamiento profiláctico de HVB en el momento de la cifoplastia. Cada sujeto recibe el testigo y las formulaciones experimentales como se ha definido anteriormente.

10 Se realiza un cribado de los posibles sujetos para determinar si cumplen con los criterios de inclusión y exclusión. Si se alcanzan todos los criterios de inclusión, se invita a los sujetos potenciales a participar en el ensayo clínico. Todos los sujetos considerados para entrar en el estudio son documentados en el registro de cribado y se registran las razones de la exclusión.

15 Todos los sujetos han sido sometidos a cifoplastia y no tienen una FVC sintomática adyacente a los dos cuerpos vertebrales tratados en este estudio. El sujeto no debe ser admitido en el estudio si el cirujano determina durante la operación que la fractura no cumple con los criterios de admisión de fracturas o existen otras fracturas que impiden el tratamiento en este protocolo.

Los grupos de tratamiento son:

20 Grupo I:  $\beta$ -TCP + tampón de acetato de sodio inyectable (testigo); y,  
Grupo II:  $\beta$ -TCP + rhPDGF-BB inyectable (experimental)

25 0,1 mg/ml rhPDGF-BB (sujetos 1-5)  
0,3 mg/ml rhPDGF-BB (sujetos 6-10)\*  
1,0 mg/ml rhPDGF-BB (sujetos 11-15)\*

\* Después de finalizada la primera visita de seguimiento postoperatorio sin reacciones adversas atribuibles al dispositivo del estudio.

30 Los dos grupos de sujetos I y II son tratados según los protocolos convencionales y el seguimiento de la cifoplastia/vertebroplastia. El sujeto es examinado por el cirujano a los 7-14 días, y a las 6, 12, 24 y 52 semanas para la tomografía computarizada cuantitativa (TCC), radiográfica y clínica. Se registró el uso de la medicación prescrita y sin receta médica. Un radiólogo independiente, ajeno a las asignaciones de los grupos de tratamiento de los pacientes, realiza análisis de TCC para evaluar la densidad ósea. Estas mediciones son documentadas y analizadas.

35 Todas las complicaciones postoperatorias y reacciones adversas relacionadas con el dispositivo se registran en el cuaderno de recogida de datos apropiado. Si un sujeto experimenta una FVC posterior durante el periodo de estudio u otro procedimiento quirúrgico por una reacción adversa grave o si se retira el dispositivo en investigación, el sujeto es monitorizado por razones de seguridad hasta el final del estudio. Se solicita a los sujetos que han sido nuevamente operados y/o a los que se les ha retirado el material ortopédico de fijación de la fractura que den su consentimiento para un examen de los explantes con fines histológicos. Todos los sujetos son monitorizados durante el experimento de 12 meses y se solicita a cualquier sujeto que solicite abandonar el estudio o que lo abandone a solicitud del investigador que proporcione una razón para la interrupción del estudio. En la Tabla 14 se proporciona un resumen del cronograma para el presente estudio.

Tabla 14 – Resumen del cronograma del estudio

50	Visita 1 Visita de cribado	Visita 2 Visita quirúrgica	Visita 3 Seguimiento Post Tx	Visita 4 Seguimiento Post Tx	Visita 5 Seguimiento Post Tx	Visita 6 Seguimiento Post Tx	Visita 7 Seguimiento Post Tx
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
55	A los 21 días de la cirugía	A los 21 días del cribado Día 0	Día 7-14	Semana 6±3 días	Semana 12±7 días	Semana 24±7 días	Semana 52±14 días

60 La variable principal de valoración es la densidad ósea a las 12 semanas después de la intervención medida mediante exploraciones TCC. Los criterios secundarios de valoración incluyen las evaluaciones de la calidad de vida y el dolor del sujeto.

65 Protocolo quirúrgico: Después de haber admitido a los sujetos en el estudio, satisfaciendo los criterios de inclusión y exclusión, se emprende el siguiente protocolo quirúrgico.



5 Se lleva a los pacientes a quirófano (OR) de la manera convencional, y se utilizan los métodos convencionales para realizar el procedimiento de cifoplastia con cementación con metacrilato de metilo del cuerpo vertebral fracturado. Se hacen radiografías convencionales de los cuerpos vertebrales tratadas con cifoplastia y con el tratamiento de aumento óseo preventivo.

10 Después del tratamiento mediante cifoplastia, el investigador identifica y clasifica los dos niveles a tratar con aumento óseo profiláctico. Si dos (2) cuerpos vertebrales clasificados no están disponibles para el tratamiento, según se determina en el momento de la cirugía, el sujeto se considera un fallo de cribado y no es admitido en el estudio.

15 Después de la identificación de las dos HVB, el investigador solicita la apertura del código de aleatorización para determinar el tratamiento de estudio administrado. El código de aleatorización especifica el tratamiento con la composición experimental (Grupo II) ya sea proximal o distalmente en relación con el nivel tratado con cifoplastia. La otra HVB se trata con la composición testigo (Grupo I)

20 La composición experimental se mezcla según el procedimiento proporcionado en el Ejemplo 1. La concentración de rhPDGF-BB utilizada depende del esquema de aumento escalonado de la dosis (a los sujetos 01-05 se les administran 0,15 mg/ml de rhPDGF; a los sujetos 06-10 se les administran 0,3 mg/ml de rhPDGF-BB, y a los sujetos 11-15 se les administra 1,0 mg/ml de rhPDGF-BB)

25 Una vez mezclada, la pasta se carga en una jeringa de inyección utilizando una técnica aséptica. Las jeringas están claramente identificadas con etiquetas proporcionadas: "Experimental" o "Testigo". Una vez mezclados los materiales de matriz experimental y testigo, el médico espera 10 minutos antes del implante. Para cada mezcla se utiliza un nuevo dispositivo de mezcla estéril (espátula). El investigador ordena al asistente que realiza la mezcla que registre la cantidad acumulada de composición implantada, así como la cantidad residual de composición no implantada. Se calcula la cantidad de composición y se documenta utilizando mediciones relativas cualitativas (1/3, 2/3, Toda).

30 Se inserta un Jamshidi® de calibre 8 a 16 disponible en Cardinal Health os Dublín, Ohio, mediante un abordaje extrapedicular en los cuerpos vertebrales que requieren tratamiento profiláctico. Se hace pasar la aguja a través del Jamshidi® y el Jamshidi® a través del estilete sobre la aguja. Se inyecta la preparación mixta apropiada en el cuerpo vertebral del sujeto. Se debe tener cuidado para minimizar la fuga de la pasta fuera del cuerpo vertebral.

35 Los agentes de contraste, según formas de realización de la presente invención, pueden ayudar a identificar la fuga de la pasta fuera del cuerpo vertebral. La figura 6 ilustra una jeringa y un aparato relacionado que penetra en el tejido que cubre un cuerpo vertebral para administrar una composición de la presente invención al cuerpo vertebral. La Figura 7 es una radiografía que ilustra la inyección de una composición de la presente invención en el cuerpo vertebral de la vértebra L3 según una forma de realización.

40 Se elimina la instrumentación. Se emplean técnicas de irrigación abundante y cierre convencional de heridas.

45 Evaluaciones de seguimiento: Se pasa consulta a los sujetos para las evaluaciones postoperatorias los días 7-14, y a las 6 ( $\pm 3$  días), 12 ( $\pm 7$  días), 24 ( $\pm 7$  días) y 52 ( $\pm 14$  días) semanas después de la cirugía. Los procedimientos y evaluaciones de rutina se realizan durante el período de seguimiento, como se especifica en el diagrama de flujo del estudio de la siguiente Tabla 15.

50

55

60

65

Tabla 15 - Diagrama de flujo del estudio y evaluaciones de seguimiento

5	Procedimiento	Cribado	Cirugía	Evaluaciones de seguimiento después del tratamiento				
		Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5	Visita 6	Visita 7
			Día 0	Día 7-14	Semana 6±3 días	Semana 12±7 días	Semana 24±7 días	Semana 52±14 días
10	Consentimiento con total conocimiento de causa	X <sup>1</sup>						
	Registro de cribado	X						
	Antecedentes médicos	X						
15	Examen físico de la columna vertebral	X	X	X	X	X	X	X
	Verificación de los criterios de elegibilidad del sujeto	X	X					
	Identificación de cuerpos vertebrales en alto riesgo	X						
20	Aleatorización		X					
	Cifoplastia y aumento óseo preventivo		X					
	Volumen de material de injerto colocado		X					
25	Evaluaciones TC cualitativas <sup>2</sup>		X		X	X	X	
	Complicaciones/reacciones adversas		X	X	X	X	X	X
30	Revisión de medicación concomitante	X	X	X	X	X	X	X
	1. Debe darse antes de cualquier procedimiento específico del estudio. 2. La tomografía computarizada cuantitativa (TCC) se lleva a cabo según el protocolo convencional para obtener los datos de DMO que es determinada por el especialista en radiología musculoesquelética							

35 EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

Se recogen los datos de resultados de este estudio sobre los resultados procedentes de las radiografías, las TCC y del examen directo de la función. El programa de estas mediciones se proporciona en la Tabla 16.

40 Tabla 16 - Frecuencia de las evaluaciones radiográficas y funcionales

Instante de tiempo	Parámetros de estudio			
	Radiografías simples	Exploraciones TC cualitativas	Dolor	Función
Antes del tratamiento	X	X	X	X
Inmediatamente después del tratamiento	X			
Día 7-14			X	
Semana 6	X	X	X	X
Semana 12	X	X	X	X
Semana 24	X	X	X	X
Semana 52	X	X	X	X

Se espera que los cuerpos vertebrales a los que se inyectó una composición que comprendía una solución de PDGF dispuesta en una matriz de β-fosfato tricálcico muestren un aumento de la densidad mineral ósea (DMO). El aumento de la densidad mineral ósea en un cuerpo vertebral puede hacer al cuerpo vertebral menos susceptible a las fracturas, incluidas las fracturas secundarias inducidas por operaciones de cifoplastia/vertebroplastia.

EJEMPLO 7

65 *Método de inhibición de fracturas vertebrales por compresión en individuos con osteoporosis*

Un método para inhibir las fracturas vertebrales por compresión en individuos con osteoporosis comprende promover la formación de hueso en los cuerpos vertebrales a través del tratamiento con composiciones que comprenden una solución de PDGF dispuesta en una matriz biocompatible, tal como  $\beta$ -fosfato tricálcico.

- 5 Las composiciones de la presente invención se mezclan según lo dispuesto en el Ejemplo 1. La concentración de PDGF en las soluciones de PDGF oscila entre 0,3 mg/ml y 1,0 mg/ml. Una vez mezclada, la composición se carga en una jeringa de inyección utilizando una técnica aséptica. El cirujano espera 10 minutos antes del implante. Para cada mezcla se utiliza un nuevo dispositivo de mezcla estéril (espátula).
- 10 Se inserta el Jamshidi® mediante un abordaje extrapedicular en los cuerpos vertebrales que requieren tratamiento profiláctico. Los cuerpos vertebrales que requieren tratamiento profiláctico, en algunas formas de realización, comprenden cuerpos vertebrales en alto riesgo incluidos los cuerpos vertebrales T5 a T12 y L1 a L4. Se hace pasar la aguja a través del Jamshidi y el Jamshidi a través del estilete sobre la aguja. Se inyecta la preparación mixta apropiada en el cuerpo vertebral del sujeto. Se tiene cuidado para minimizar la fuga de la pasta fuera del cuerpo
- 15 vertebral. Se trata una pluralidad de cuerpos vertebrales según el presente ejemplo. Los pacientes con osteoporosis que reciben este tratamiento tienen una menor incidencia de fracturas vertebrales por compresión que los pacientes con osteoporosis no tratados.

#### 20 EJEMPLO 8

*Evaluación de la seguridad a largo plazo del rh-PDGF-BB combinado con matriz de colágeno/ $\beta$ -fosfato tricálcico en un modelo de implante paravertebral en conejo*

- 25 Diseño experimental y visión de conjunto: Este estudio evaluaba la seguridad del implante del material de rhPDGF-BB/colágeno/ $\beta$ -TCP inyectable en un sitio intramuscular paravertebral adyacente a la columna vertebral de los conejos. Se observó a los animales para detectar signos de neurotoxicidad, y se examinaron histológicamente los sitios del implante con los cuerpos vertebrales adyacentes y la médula espinal para documentar las respuestas específicas de tejido al material.

- 30 El protocolo de estudio y el cuidado de los animales fueron autorizados por el IACUC local y se llevaron a cabo según las directrices de la AAALAC. Se asignaron doce (12) conejos de Nueva Zelanda albinos hembra, no tratados previamente, con un peso  $\geq$  2,5 kg, a uno de 4 grupos: 0,3 mg/ml de PDGF; 1,0 mg/ml de PDGF; caucho; o tampón de acetato. Los conejos tratados con PDGF recibieron implantes de 0,2 cc de rhPDGF-BB adecuadamente concentrado en matriz inyectados en una cavidad de 1 cm en el músculo paravertebral derecho adyacente a los
- 35 cuerpos vertebrales L4-L5, mientras que se implantó polietileno de alta densidad (HDPE) en una incisión similar en los músculos paravertebrales izquierdos cerca de los L2-L3 de los mismos animales. Los conejos en el grupo del tampón de acetato de sodio recibieron tampón de acetato de sodio en lugar del implante de PDGF+matriz, mientras que aquellos en el grupo del caucho recibieron sólo caucho en el músculo paravertebral derecho. Se sacrificó un conejo de cada grupo a los 30, 90 y 180 días después de la cirugía.

- 40 Se midieron los pesos corporales antes de la cirugía y cada dos semanas después de la cirugía durante el tiempo que duró el estudio. Se hicieron radiografías antes de la cirugía, inmediatamente después de la cirugía, e inmediatamente antes del sacrificio. La fotografía digital de los sitios quirúrgicos se realizó durante la cirugía y en los puntos finales del estudio. Se registraron las observaciones clínicas semanales de los sitios de implante para
- 45 detectar signos de eritema, edema e inflamación y para detectar signos de neurotoxicidad, tales como cambios ambulatorios. En la necropsia, se recogieron en bloque cada uno de los sitios del implante junto con el cuerpo vertebral adyacente y la médula espinal, se fijaron en formalina y se prepararon para un análisis histopatológico embebidos en parafina y descalcificados.

- 50 Materiales: Las dosis de rhPDGF-BB ensayadas en este estudio incluyeron 0,3 mg/ml y 1,0 mg/ml en tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 6,0 +/- 0,5. El material de la matriz consistió en colágeno bovino tipo I al 20% liofilizado y  $\beta$ -TCP al 80% con un tamaño de partícula de 100  $\mu$ m-300  $\mu$ m (Kensley Nash Corporation). El material de control negativo consistió en polietileno de alta densidad (HDPE) y el material de control positivo consistió en caucho negro. Inmediatamente antes de la cirugía, se mezclaron las soluciones de rhPDGF-BB y testigo con el material de matriz
- 55 en una relación entre líquido y masa de 3:1.

- En resumen, se dejó que la solución de PDGF saturase el material durante 2 minutos y a continuación se mezcló manualmente para generar una consistencia pastosa. La distribución homogénea del rhPDGF-BB por todo el material mezclado utilizando esta técnica de mezcla se confirmó eluyendo el PDGF a partir de muestras de masa
- 60 similar y a continuación, cuantificando el PDGF mediante ELISA (R&D Systems).

- Resultados: Tras la mezcla manual de 0,3 mg/ml de rhPDGF-BB con la matriz de colágeno/ $\beta$ -TCP, se confirmó que la homogeneidad del rhPDGF-BB por todo el material mezclado se encontraba dentro de un +/-4% de error en las
- 65 muestras.

- Todos los animales se recuperaron de la cirugía, y en el momento de redactar el presente documento, se informó que todas las observaciones clínicas eran normales sin signos de neurotoxicidad o cicatrización anormal en los sitios

quirúrgicos. Dos animales tratados el testigo de matriz y tampón de acetato de sodio mostraron menor formación de costras en las heridas quirúrgicas, que sanaron por completo. Un animal que recibió 0,3 mg/ml de rhPDGF-BB presentó un ligero eritema en el sitio quirúrgico 3-4 días después de la cirugía y a continuación recuperó su apariencia normal. Un análisis histopatológico de los sitios de implante del producto experimental 29 días después de la cirugía indicó una leve cantidad de crecimiento interno de tejido en los materiales de ensayo implantados y una respuesta inflamatoria suave. No se observó formación de hueso ectópico o anormal en los cuerpos vertebrales adyacentes a los sitios de implante. Estos resultados se resumen en la Tabla 17 y se comparan con las puntuaciones de los sitios de implante con el control negativo HDPE.

Tabla 17 - Resumen de los resultados histopatológicos en los sitios de implante 29 días después de la cirugía

[PDGF-BB] (mg/ml)	Macrófagos	MGC	Crecimiento interno de tejido	Hueso ectópico	Exostosis
0,3	3, 1 (NC)	2, 0 (NC)	2,0 (NC)	0,0 (NC)	0,0 (NC)
1,0	2, 2 (NC)	2, 0 (NC)	2,0 (NC)	0,0 (NC)	0,0 (NC)
NC = control negativo; MGC = células gigantes multinucleadas; Escala de biorreactividad: 0 = ausente, 1 = mínima/leve, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = Marcada/Fuerte					

La pruebas preliminares de este estudio en base a las observaciones clínicas, sugiere que el colágeno/β-fosfato tricálcico combinado con 1,0 mg/ml, con 0,3 mg/ml de rhPDGF-BB o con tampón de acetato de sodio no provoca efectos neurotóxicos agudos o crónicos. La evaluación histopatológica de los sitios de implante 29 días después de la cirugía indicaba una cantidad leve esperada y normal de crecimiento interno de tejido en el material implantado y una respuesta inflamatoria suave. No se observó formación de hueso ectópico, exostosis ni resorción ósea anormal en ninguno de los sitios de implante. En base a las observaciones de los animales tratados en este estudio, el colágeno/β-fosfato tricálcico combinado con 1,0 mg/ml, con 0,3 mg/ml de rhPDGF-BB puede utilizarse sin riesgo cuando se inyecta muy cerca de la columna vertebral.

**Reivindicaciones**

1. Composición que consiste en:
  - 5 a) una matriz biocompatible biorreabsorbible que consiste en un material de armazón óseo seleccionado del grupo que consiste de partículas de un fosfato cálcico poroso y partículas de un aloinjerto óseo poroso; y
  - b) una solución que consiste en PDGF a una concentración en un intervalo comprendido entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 1,0 mg/ml, en la que la solución está dispuesta en la matriz biocompatible
- 10 para su uso en el fortalecimiento de un hueso de un paciente, en donde el hueso es un húmero, cúbito, radio, fémur, tibia, peroné, rótula, hueso del tobillo, hueso de la muñeca, carpo, metacarpo, falange, tarso, metatarso, costilla, esternón, vértebras, escápula, clavícula, pelvis o sacro, en donde la composición facilita la formación ósea.
- 15 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el fortalecimiento es para el tratamiento profiláctico del hueso.
- 20 3. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el hueso es susceptible de aumento de carga compensatoria.
- 25 4. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el hueso es un hueso vertebral, para su uso en reducir la probabilidad de una fractura vertebral por compresión o una fractura vertebral por compresión secundaria.
- 30 5. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el hueso está fracturado.
- 35 6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el PDGF comprende PDGF-BB, preferiblemente PDGF-BB humano recombinante (rh), particularmente a al menos un 65% de rhPDGF-BB intacto.
- 40 7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el PDGF está presente en el líquido a una concentración de alrededor de 0.3 mg/ml.
- 45 8. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición es fluida.
- 50 9. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el material de armazón óseo:
  - a) comprende una porosidad mayor del 50%; y/o
  - b) comprende una porosidad que facilita el crecimiento del tejido en la composición; y/o
  - c) comprende macroporos.
- 55 10. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el material de armazón óseo consiste de partículas en un intervalo de alrededor de 1 micra a alrededor de 5000 micras de tamaño.
- 60 11. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el material de armazón óseo consiste de partículas en un intervalo de alrededor de 1000 a alrededor de 5000 micras de tamaño.
- 65 12. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el material de armazón óseo consiste de partículas en un intervalo de alrededor de 100 a alrededor de 400 micras de tamaño, o en un intervalo de alrededor de 75 a alrededor de 300 micras de tamaño.
13. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el material de armazón óseo es un aloinjerto óseo poroso, preferiblemente un aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado o una matriz ósea desmineralizada particulada.
14. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el material de armazón óseo es un fosfato cálcico poroso.
15. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 ó 14, en la que el fosfato calcio poroso es fosfato  $\beta$ -tricálcico.
16. Composición para su uso según la reivindicación 15, en la que el fosfato  $\beta$ -tricálcico comprende poros interconectados.
17. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que la composición consiste del material de armazón óseo y la solución de PDGF, en la que la solución de PDGF consiste de PDGF en un tampón.

18. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, comprendiendo adicionalmente un aglutinante biocompatible, particularmente en la que el aglutinante es colágeno.
- 5 19. Composición para su uso según la reivindicación 18, en la que la composición consiste del material de armazón óseo, el aglutinante biocompatible, y la solución de PDGF, en la que la solución de PDGF consiste de PDGF en un tampón.
- 10 20. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la matriz biocompatible es reabsorbida dentro de 1 año desde la implantación.
21. Composición para su uso según la reivindicación 18, en la que el colágeno está presente en la matriz biocompatible en una cantidad que varía de alrededor del 5 por ciento en peso a alrededor del 50 por ciento en peso.
- 15 22. Composición para su uso según la reivindicación 18, en la que el colágeno está presente en la matriz biocompatible en una cantidad de alrededor del 20 por ciento en peso.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

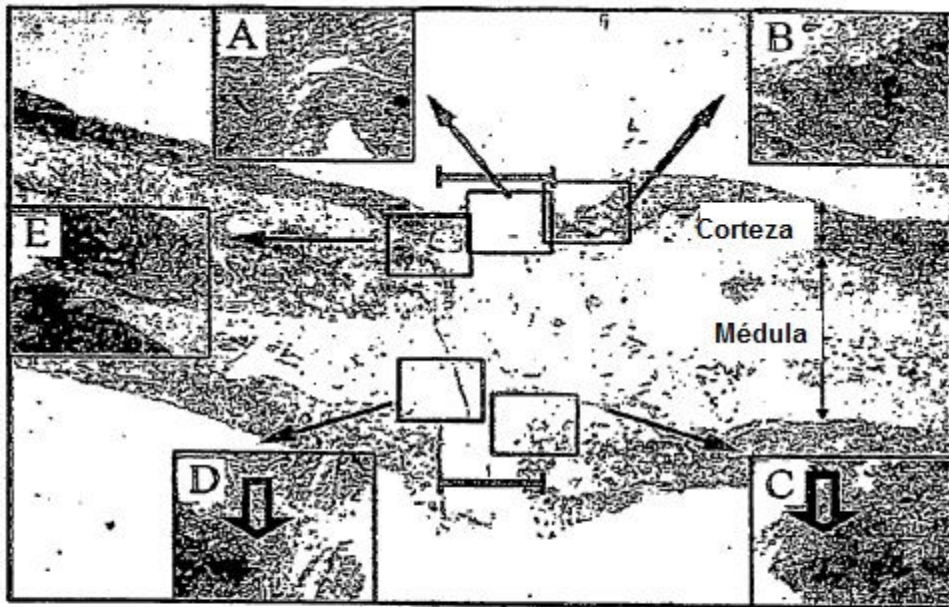


Figura 1

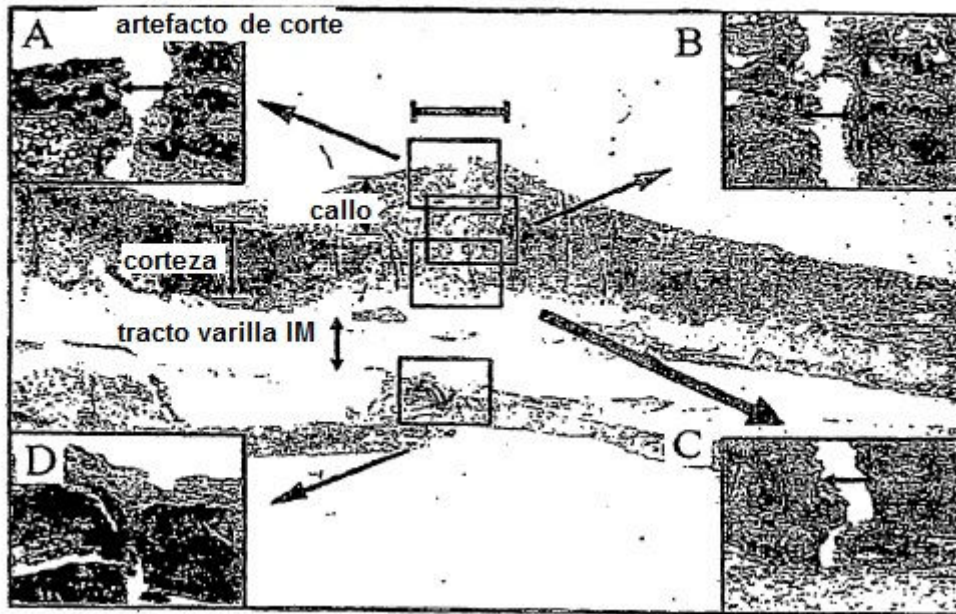


Figura 2



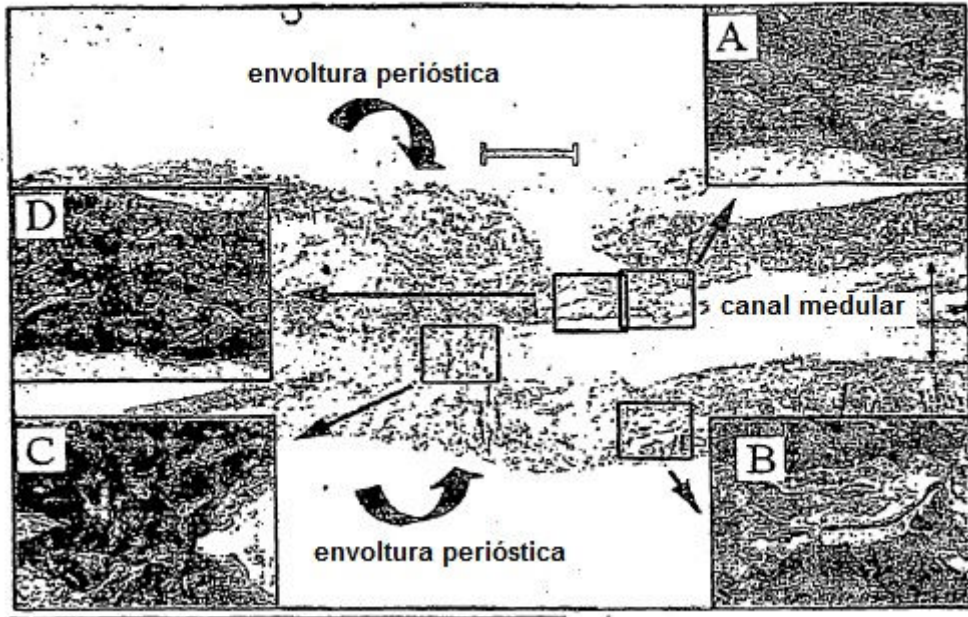


Figura 3

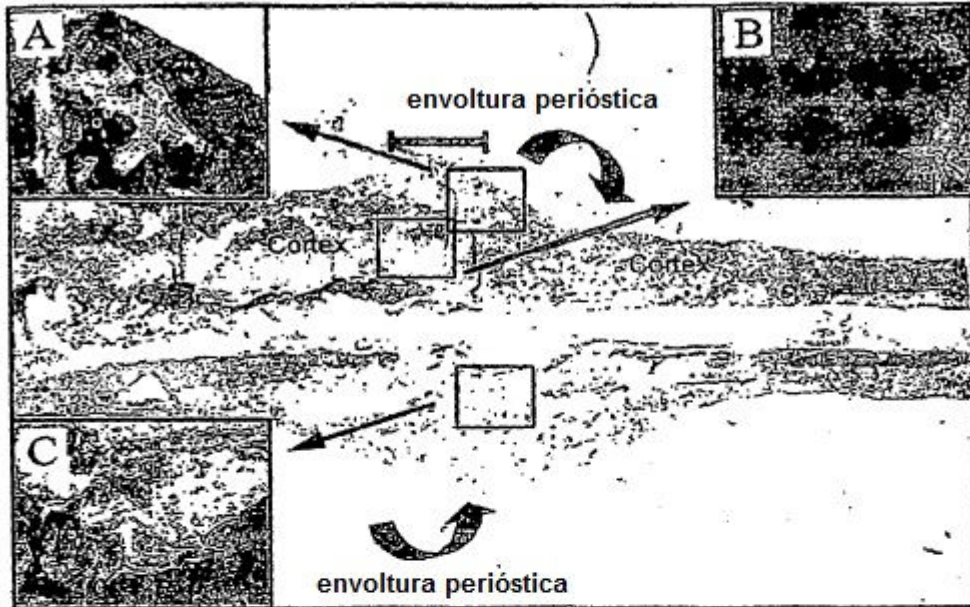


Figura 4

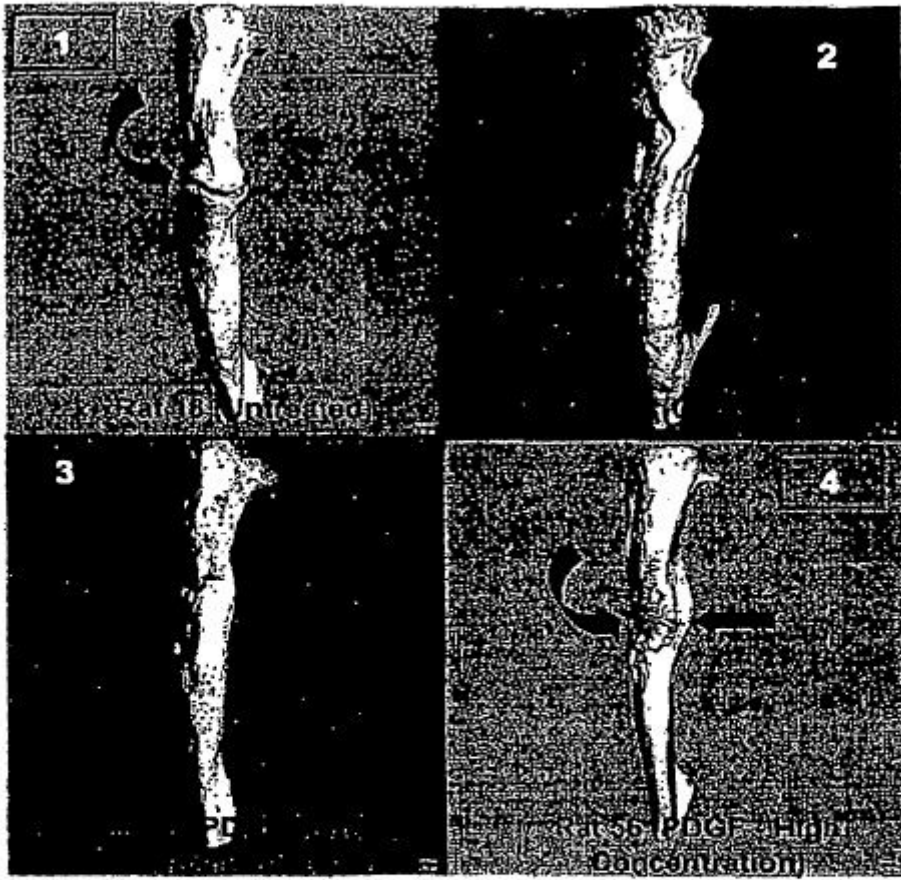


Figura 5

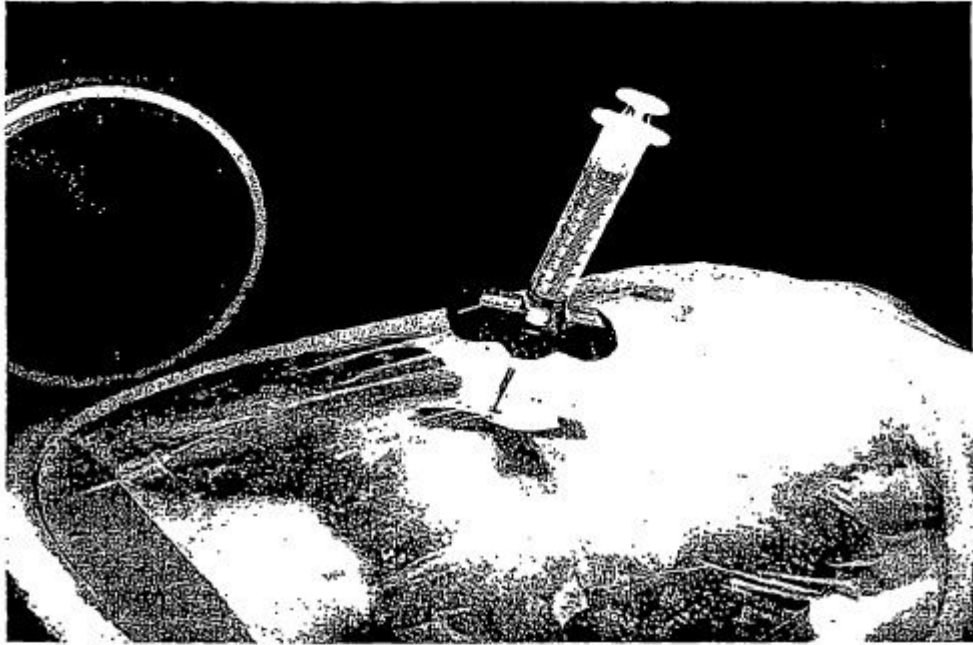


FIGURA 6

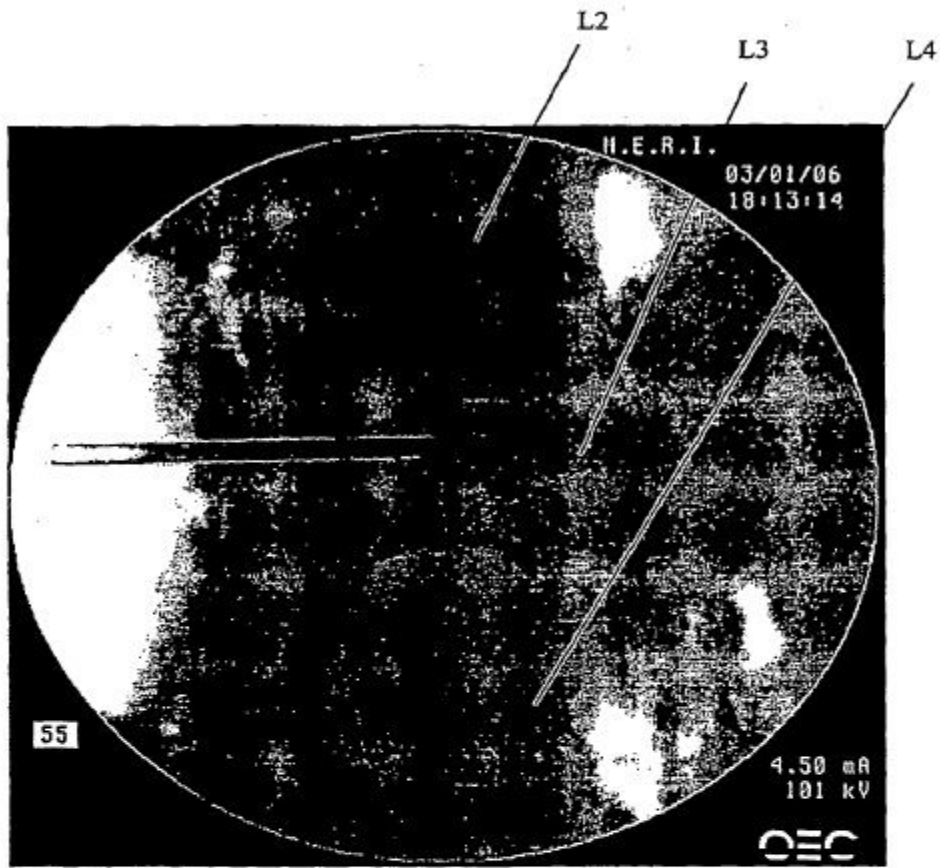


FIGURA 7