

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 202**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2000** **E 09157338 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015** **EP 2077107**

54 Título: **Estructuras que contienen calcio y procedimientos de fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

08.07.1999 US 143333 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2015

73 Titular/es:

CAP BIOTECHNOLOGY, INC. (100.0%)
UNIT C, 15400 W. 44TH AVENUE
GOLDEN, CO 80403, US

72 Inventor/es:

STARLING, L. BRIAN

74 Agente/Representante:

POLO FLORES, Carlos

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 543 202 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estructuras que contienen calcio y procedimientos de fabricación y uso de las mismas.

5 Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a estructuras que contienen calcio para el uso como portadoras de óxido nítrico.

10 Antecedentes de la invención

- Un análisis excelente de óxido nítrico en aplicaciones biológicas se menciona en la Encyclopedia of Inorganic Chemistry, Volumen 5, 2482-2498, John Wiley e Hijos (1994) y Nitric Oxide in Health and Disease, por J. Lincoln, Cambridge University Press, Cambridge, Nueva York y Melbourne, 1997. Estas referencias mencionan que el óxido
- 15 nítrico (NO) se produce naturalmente en el cuerpo y se usa a nivel celular como una defensa contra los organismos invasores, como un regulador del tono vascular y como un agente de señalización neuronal. La concentración de óxido nítrico y la presencia de agentes inhibidores o agentes promotores biológicos determinan el resultado final, tanto promover la proliferación de tejido, la salud o la destrucción de tejido.
- 20 De acuerdo con estas referencias, hay tres tipos de precursores celulares de NO. Todos ellos se identifican como óxido nítrico sintasas (NOS): el Tipo I se asocia con las neuronas, el Tipo II se asocia con una variedad de tipos de células, pero se asocia principalmente con la respuesta del huésped a la infección o los organismos invasores. El Tipo III se asocia principalmente con las células endoteliales.
- 25 NO ha estado implicado en aumentar el flujo sanguíneo por dilatación arterial, lo cual puede impactar de forma beneficiosa en la función cardíaca, la erección del pene, y el mantenimiento de la irrigación sanguínea a los órganos periféricos (Ziche y col., Journal of Clinical Investigation, 94, 2036-44. De acuerdo con J. Lincoln, Nitric Oxide in Health and Disease, Cambridge University Press, Cambridge, Nueva York y Melbourne, 1997, NO y los antagonistas de NO se han usado para tratar afecciones asmáticas. Igualmente, NO se ha usado para aumentar la función
- 30 nerviosa (Schuman y col., Annual Reviews of Neuroscience, 17, 153-83, 1994). Por el contrario, en grandes concentraciones, se ha documentado que NO es citotóxico para formaciones tumorales (Rocha y col., International Journal of Cancer, 63, 405-11, 1995). También se ha sugerido que NO juega una serie de papeles en la función renal incluyendo el flujo sanguíneo renal, la secreción de renina y la natriuresis y diuresis inducidas por presión (Bachmann y col., American Journal of Kidney Diseases, 24, 112-29, 1994). NO también ha estado implicado como
- 35 un factor de crecimiento (J. Lincoln, Nitric Oxide in Health and Disease, Cambridge University Press, Cambridge, Nueva York y Melbourne, 1997). El óxido nítrico también se puede usar para tratar patógenos y otros organismos invasores como se expone por James, S.L., Microbiological Reviews, 59, 533-47, 1995.
- Tam y col., Life Sciences, 51, 1277-84, 1992 describe un procedimiento de producir NO a partir de nitrito de sodio y
- 40 ácido clorhídrico. NO también se puede comprar como un gas purificado de proveedores comerciales como Matheson Gas Products, Cucamonga, CA. También, Manahan en Environmental Chemistry, 6ª Edición, Lewis Publishers (1994) describe procedimientos para la formación de NO a altas temperaturas a partir de N₂ y O₂ en atmósferas controladas. Ishii y col., American Journal of Physiology, 261, 598-603, 1991 describe un procedimiento de producir NO a partir de nitrito de sodio y ácido clorhídrico.
- 45 El tratamiento de desórdenes biológicos con compuestos poliméricos que se unen a composiciones de NO se expone en la Patente estadounidense núm. 5.718.892 (Keefer y col.). Esta patente demuestra además la utilidad de suministrar NO para otras aplicaciones médicas. Otras formas de precursores de compuestos de NO incluyen óxido nítrico sintasa o L-arginina. También, el superóxido-dismutasa provoca un aumento de la producción de NO libre
- 50 como se menciona por Hobbs y col., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Nov. 8: 91, (23): 10992-6, 1994. Asimismo, NO es un mensajero fisiológico y agente citotóxico dependiente de otros agentes mediadores (J. Lincoln, Nitric Oxide in Health and Disease, Cambridge University Press, Cambridge, Nueva York y Melbourne, 1997).
- 55 Los Tipos I y III de NOS (óxido nítrico sintasa) dependen de niveles elevados de Ca²⁺ para activarse, y el Tipo II se regula en un menor grado por la presencia de Ca²⁺ (Jordan y col., Surgery, 118, 138-45, 1995). Estas referencias conjuntamente indican que los tres tipos de óxido nítrico sintasas se regulan en cierto grado, directamente o bien indirectamente, por la presencia de calcio. También Schuman y col., Annual Reviews of Neuroscience, 17, 153-83, 1994 mostró que la fosforilación de NOS de Tipo I puede formar un mecanismo adicional para regular su actividad.

Procedimientos para la extracción y la purificación de los tres tipos de NOS son dados por Fosterman y col., Methods in Enzymology, 233:258-64, 1994. Se debería observar también que NOS se regula por la presencia de NO de acuerdo con Rengasamy y col., Molecular Pharmacology, 1993, Jul, 44 (1): 124-8.

- 5 La tecnología actual para el suministro de óxido nítrico para aplicaciones médicas generalmente depende de polímeros para aplicaciones de implantes y no prevé la necesidad de la presencia de calcio y/o fosfato para regular el óxido nítrico o los precursores de óxido nítrico. Igualmente, para aplicaciones sin implantes los componentes de óxido nítrico se suministran generalmente por inhalación, o como agentes farmacéuticos libres. También, el óxido nítrico o sustancias que contienen óxidos nítricos, no han sido previamente encapsulados en o usados en conjunción
10 con materiales de cerámica o de vidrio para el suministro de óxido nítrico para aplicaciones médicas.

Según esto, existe la necesidad de nuevos sustratos implantables así como de procedimientos de suministrar de forma efectiva NO a un lugar deseado. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

15

Resumen de la invención

- En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que contiene calcio que comprende microestructuras o partículas porosas o huecas que contienen óxido nítrico o un compuesto que forma óxido nítrico,
20 en la que las microestructuras comprenden hidroxiapatita, fosfato de calcio tribásico, fosfato tetracálcico, fosfato dicálcico, carbonato de calcio, óxido de calcio, fosfato de calcio que contiene vidrio, o una mezcla de los mismos.

Preferentemente, las microestructuras tienen un diámetro de 250 μm a 6 mm.

- 25 Preferentemente, dicha composición comprende además un inhibidor o activador de óxido nítrico.

Preferentemente, el compuesto que forma óxido nítrico es óxido nítrico sintasa o L-arginina.

- En algunas formas de realización, la composición está recubierta de un polímero biorreabsorbible. De forma adecuada, el polímero es ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona, poli α -hidroxiésteres, polifosfacenos, polianhidridos, o fumarato de polipropileno.
30

- En un segundo aspecto, la invención se refiere a la composición descrita anteriormente para el uso en el suministro de óxido nítrico a un lugar deseado en un paciente con la necesidad de óxido nítrico, que comprende poner en
35 contacto el lugar con la composición.

- Preferentemente, el uso es como un factor de crecimiento; para tratar un patógeno, un tumor, o un organismo invasor; o para mejorar la regulación del sistema inmunológico, el tono vascular o la señalización neuronal; en la que una cantidad efectiva de óxido nítrico o del compuesto que forma óxido nítrico está contenida dentro de las
40 microestructuras de la composición.

Preferentemente, la composición para el uso en el suministro de óxido nítrico comprende además un inhibidor o activador de óxido nítrico administrado al paciente para regular la actividad de óxido nítrico.

- 45 Descripción detallada de la invención

- Microestructuras huecas que contienen calcio útiles incluyen las microesferas huecas de fosfato de calcio (CaP) como se describe en la publicación PCT WO-98/43558. Fosfato de calcio particularmente útil para fabricar las microestructuras huecas de CaP incluye hidroxiapatita, fosfato tricálcico (alfa- y/o beta-), fosfato dicálcico (formas
50 hidratada y/o anhidra), y fosfato tetracálcico. Estas microestructuras huecas se pueden fabricar en forma porosa o densa como se describe en la publicación PCT WO-98/43558.

- De forma alternativa, se pueden usar microestructuras huecas de óxido de calcio/hidróxido de calcio o mezclas de microestructuras huecas de CaP y óxido de calcio/hidróxido de calcio. Éstas se pueden preparar de la misma
55 manera que la descrita para las microesferas de fosfato de calcio en la publicación PCT WO-98/43558 o como se describe en la Patente estadounidense núm. 4.133.854, que describe procedimientos para fabricar microesferas huecas pequeñas de vidrio, metal o plástico.

La presente invención proporciona los efectos beneficiosos del óxido nítrico para potenciar el crecimiento y la

proliferación del tejido. Más particularmente, la (1) contención de gas de NO ó (2) líquido que contiene NO en concentraciones de la cantidad deseada ó (3) compuestos precursores de NO están todos destinados a proporcionar un efecto terapéutico o potenciar la proliferación de células o tejidos durante el cultivo celular mediante la acción como un factor de crecimiento. Tal concentración se puede controlar por la dilución del NO arrastrado con gases inertes como el argón. Igualmente la concentración de NO en el líquido se puede controlar por procedimientos similares.

La razón principal para usar un sustrato de calcio es que los Tipos I y II de NOS dependen de niveles elevados de Ca^{2+} para activarse. Igualmente, el Tipo III también se regula en un menor grado por la presencia de Ca^{2+} . Por esta razón, los sustratos implantables como se especifica anteriormente son candidatos útiles para el suministro de NOS al lugar de la implantación o durante el cultivo celular. Igualmente, estos sustratos que contienen calcio son candidatos útiles para el suministro de tipos de células que producen el tipo de NOS requerido en el lugar del implante. Asimismo, agentes como L-arginina y aminoguanidina también se pueden suministrar como agentes que median en la formación de NO dentro de las células. Sin embargo, el mecanismo para producir la respuesta deseada también depende de la concentración resultante de NO y la presencia o ausencia de otros activadores e inhibidores conocidos. Estos precursores, inhibidores y activadores se pueden suministrar simultáneamente o en suministros posteriores al lugar del implante o los medios de cultivo celular.

Según esto, la presente solicitud describe procedimientos novedosos para suministrar óxido nítrico a lugares localizados, por ejemplo, lugares de implantes o biorreactores para el caso del cultivo celular. Los procedimientos se logran generalmente encapsulando inicialmente óxido nítrico o precursor de NO dentro o sobre las microestructuras o partículas porosas o huecas descritas anteriormente.

Por ejemplo, gas de NO o líquidos que contienen NO se pueden encapsular en porciones huecas de vidrio de calcio/fosfato y colocar o inyectar en el lugar del implante, y el óxido nítrico encapsulado se libera posteriormente in vivo o in vitro reabsorbiéndose el material implantable con fines terapéuticos. Igualmente, el gas de NO o gas que contiene líquido se podría infiltrar en partículas porosas o huecas de calcio/fosfato de calcio que se sellan posteriormente con un polímero biorreabsorbible como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona, poli α -hidroxiésteres, polifosfacenos, polianhídridos, y fumarato de polipropileno u otro polímero biocompatible, biorreabsorbible y/o biopermeable. Tras la implantación el polímero se reabsorbería o bien tendría en cuenta la liberación del NO. El gas se puede incorporar a la fibra, perla u otra forma hueca de vidrio teniendo una atmósfera saturada del gas, en la que una forma fundida está cerrada alrededor del gas, o las aberturas de la forma hueca se cierran por pinzado fundiendo el vidrio. De manera similar a las ampollas, que contienen soluciones líquidas de amoníaco en contenedores de vidrio pequeños sellados, se pueden preparar líquidos que contienen NO para el suministro al lugar del implante. Líquidos como agua que contiene NO se podrían usar para empapar las estructuras porosas o huecas que se sellan posteriormente en su lugar mediante recubrimientos orgánicos o poliméricos como se menciona previamente, o mediante atrapamiento por la fusión localizada de las aberturas de las estructuras huecas de tal manera que se cierran por el material de alojamiento.

Se pueden usar vidrios biológicos (por ejemplo, Bioglass[®]) para aplicaciones de implantes. Los vidrios biológicos son a base de silicato de sodio pero incorporan CaO y P_2O_5 en su composición. Composiciones típicas se describen en las Patentes estadounidenses núms. 5.981.412 (Hench y col.) y 4.608.350 (Howard). Las propiedades del vidrio fundido son propicias para las técnicas de fabricación de formas huecas (como bombillas) conocidas para los expertos en la materia se describen en The Technology of Glass and Ceramic: An Introduction, Glass Science Technology, No. 4, J. Hlavac, Elsevier Scientific Publishing Co., Nueva York y Amsterdam (1983). Procedimientos para fabricar microesferas de vidrio se detallan en las Patentes estadounidenses núms. 5.176.732 (Block y col.), 4.133.854 (Hendricks), y 4.767.726 (Marshall). Asimismo, procedimientos para introducir un gas en microesferas de vidrio se dan en las Patentes estadounidenses núms. 4.257.798 (Hendricks y col.) y 4.547.233 (Delzant).

Otros procedimientos para fabricar estructuras que contienen gas para gases distintos a NO son fácilmente conocidos para los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, los procedimientos descritos en la

Patente estadounidense núm. 4.257.798, que describe procedimientos para introducir gases en microesferas. De forma alternativa, el material de calcio y/o de fosfato de calcio también se podría encapsular en una forma particular en un polímero portador, consiguiéndose de ese modo la naturaleza activadora del Ca^{2+} liberado del compuesto que contiene calcio.

El suministro de NO u otros agentes o células inductoras de NO también tiene aplicación en el cultivo de células in vitro (aplicaciones de cultivo celular/biorreactor) y tejidos y bioproductos derivados de ellos. Ejemplos de estructuras

que contienen calcio con alguna forma de NO se proporcionan en los Ejemplos a continuación.

Todas las composiciones descritas en los ejemplos se pueden usar como agentes terapéuticos médicos o potenciaciones para las aplicaciones de cultivo celular.

- 5 Los siguientes ejemplos ilustran, pero no se pretende que limiten, diversas formas de realización de la presente invención.

EJEMPLO 1

10 Estructuras que contienen gas de NO

El gas de NO obtenido de Matheson Specialty Gas o NO producido por procedimientos como se describe previamente más arriba se introduce en una cámara de vacío y se rellena mientras se forman microesferas huecas de vidrio como se describe en la Patente estadounidense núm. 4.257.798 (Hendricks y col.). En este ejemplo, las
15 microesferas huecas de vidrio están fabricadas en una composición de vidrio de acuerdo con la Patente estadounidense núm. 5.981.412 (Hench y col.), que es aproximadamente SiO₂ al 47%, CaO al 24%, Na₂O al 24% y P₂O₅ al 5%. La composición de vidrio se funde inicialmente por encima de los 800°C y se procesa de acuerdo con Hendricks para producir microesferas huecas que contienen NO. Este procedimiento se puede mejorar al fabricar gas de NO in situ introduciendo gases de nitrógeno y oxígeno a temperaturas mayores de 800°C para formar NO
20 durante la fabricación de las estructuras huecas de vidrio.

EJEMPLO 2

Estructuras que contienen gas de NO

25 El gas de NO obtenido de Matheson Specialty Gas o NO producido por procedimientos como se describe previamente más arriba se introduce en un tubo de vidrio o fibra hueca de vacío. Después de llenarse con gas de NO, el tubo de vidrio o fibra hueca se corta con un cable de Nicromo, que es calentado por resistencia por encima de los 800°C y es pasado rápidamente a través de la estructura de vidrio para sellar el gas de NO dentro de las
30 estructuras segmentadas sin la descomposición del gas de NO encapsulado. Esta técnica también se puede usar para encapsular soluciones acuosas que contienen NO introduciendo el líquido en los tubos de vidrio o fibras huecas.

EJEMPLO 3

35 Estructuras que contienen gas de NO selladas con polímero

Una estructura porosa que contiene calcio como una mezcla del 75% en peso de fosfato tricálcico y del 25% en peso de hidroxiapatita se sintetiza en microesferas o partículas huecas con un diámetro de 500 micrones. La estructura se
40 sinteriza entonces por encima de los 1000°C para producir estructuras porosas. Estas microesferas o partículas se colocan posteriormente en una cámara de vacío y se rellenan con gas de NO como se describe previamente y a una presión atmosférica en un recipiente calentado sellado que tiene un agitador. El recipiente que contiene las microesferas o partículas tratadas con NO se calienta por encima del punto de fusión del polímero. La dosis del polímero fundido como policaprolactona se introduce entonces en el recipiente sellado mientras las microesferas o
45 partículas se agitan. La dosis de una cantidad suficiente de polímero se deposita sobre las microesferas o partículas huecas en la medida en que se inicie la aglomeración de las partículas. La cantidad de polímero se puede ajustar para cambiar la tasa de biodegradación. La agitación continúa mientras se permite que los aglomerados recubiertos de polímero se enfríen para formar una superficie sellada sobre las microesferas o partículas aglomeradas. También, se puede usar la polimerización de la solución en una atmósfera de NO controlada en lugar de fundir un polímero
50 para producir un recubrimiento polimérico que encapsule NO con microesferas o partículas huecas.

EJEMPLO 4

Recubrimientos de NOS o de precursor de NO sobre microestructuras o partículas huecas que contienen calcio

55 Una estructura porosa que contiene calcio como una mezcla del 75% en peso de fosfato tricálcico y del 25% en peso de hidroxiapatita se sintetiza en microesferas o partículas huecas con un diámetro de 500 micrones. NOS se prepara mediante procedimientos expuestos por Fosterman y col., Methods in Enzymology, 233, 258-64, 1994. El tipo de NOS deseado, como el Tipo I, se mezcla con las microestructuras o partículas huecas que contienen calcio para

formar un recubrimiento sobre las mismas. Igualmente, se puede usar L-arginina como un precursor de NO o con superóxido-dismutasa como un potenciador de actividad biológica y mezclarse con las microestructuras o partículas huecas que contienen calcio para formar un recubrimiento sobre las mismas como se describe anteriormente. Una modificación adicional de NOS de Tipo II es la incorporación de inhibidores de NO como aminoguanidina para regular la liberación de NO como se especifica en Nitric Oxide in Health and Disease, por J. Lincoln, Cambridge University Press, Cambridge, Nueva York y Melbourne, p. 153, 1997.

EJEMPLO 5

10 Materiales poliméricos, que liberan NO usado en conjunción con compuestos que contienen calcio

Una estructura que contiene calcio como una mezcla del 75% en peso de fosfato tricálcico y del 25% en peso de hidroxiapatita se sintetiza en microesferas o partículas huecas con un diámetro de 500 micrones. Dicha estructura se mezcla con un material polimérico, que libera NO como se describe por la Patente estadounidense núm. 5.994.444 (Trescony y col.). Por ejemplo, un copolímero de ácido poliláctico y ácido poliglicólico con nitrito inorgánico dispersado dentro del copolímero se mezcla entonces con más del 5 por ciento en volumen de dicha estructura que contiene calcio. Dicha mezcla se puede usar con o sin adiciones de NOS.

Mientras que diversas formas de realización de la presente invención se han descrito en detalle, es evidente que se producirán modificaciones y adaptaciones de esas formas de realización para los expertos en la materia. Se debe entender expresamente, sin embargo, que tales modificaciones y adaptaciones se hallan dentro del ámbito de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene calcio que comprende microestructuras o partículas porosas o huecas que contienen óxido nítrico o un compuesto que forma óxido nítrico, en la que las microestructuras comprenden
5 hidroxapatita, fosfato de calcio tribásico, fosfato tetracálcico, fosfato dicálcico, carbonato de calcio, óxido de calcio, fosfato de calcio que contiene vidrio, o una mezcla de los mismos.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que las microestructuras comprenden un polímero.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en la que el óxido nítrico está contenido dentro de la composición como un gas, en un líquido o una mezcla de los mismos.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que las microestructuras tienen un diámetro de 250 μm a
6 mm.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende además un inhibidor o activador de óxido nítrico.
6. La composición de la reivindicación 1, en la que el compuesto que forma óxido nítrico es óxido nítrico
20 sintasa o L-arginina.
7. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende microestructuras porosas o huecas y las microestructuras porosas y huecas contienen óxido nítrico o un compuesto que forma óxido nítrico, y
25 en la que el compuesto que forma óxido nítrico es óxido nítrico sintasa.
8. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición está recubierta de un polímero biorreabsorbible.
9. La composición de la reivindicación 8, en la que el polímero es ácido poliláctico, ácido poliglicólico,
30 policaprolactona, poli α -hidroxiésteres, polifosfacenos, polianhídridos, o fumarato de polipropileno.
10. La composición de la reivindicación 1 para el uso en el suministro de óxido nítrico a un lugar deseado en un paciente con la necesidad de óxido nítrico, que comprende poner en contacto el lugar con la composición.
- 35 11. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 para el uso como un factor de crecimiento; para tratar un patógeno, un tumor, o un organismo invasor; o para mejorar la regulación del sistema inmunológico, el tono vascular o la señalización neuronal; en la que una cantidad efectiva de óxido nítrico o del compuesto que forma óxido nítrico está contenida dentro de las microestructuras de la composición.
- 40 12. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además un inhibidor o activador de óxido nítrico administrado al paciente para regular la actividad de óxido nítrico.