

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 081**

51 Int. Cl.:

A61L 27/22	(2006.01) A61K 33/00	(2006.01)
A61P 19/08	(2006.01)	
A61K 38/29	(2006.01)	
A61K 38/36	(2006.01)	
A61K 38/48	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 33/06	(2006.01)	
A61L 27/44	(2006.01)	
A61L 27/50	(2006.01)	
A61K 33/42	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2008** **E 14003058 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016** **EP 2823829**

54 Título: **Composiciones de fibrina que contienen compuestos de estroncio para su uso en el crecimiento óseo**

30 Prioridad:

23.04.2007 US 925716 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2016

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

BARRY, JOHN J.;
GOESSL, ANDREAS y
ZIMMER, GERALD

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBETA, Pablo

ES 2 594 081 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de fibrina que contienen compuestos de estroncio para su uso en el crecimiento óseo

- 5 En general, la presente invención se refiere a una composición para su uso en la cicatrización o en el crecimiento óseo que comprende fibrinógeno, trombina y un compuesto que contiene estroncio (Sr), donde el estroncio está presente en una sal de cálcica sustituida con estroncio.

10 La práctica actual en la cicatrización y regeneración ósea es rellenar huecos del hueso con injertos óseos (autoinjerto o aloinjerto), cementos óseos, como polimetilmetacrilato (PMMA), o materiales de relleno de huecos de sales cálcicas inyectables o implantables. Los autoinjertos son la opción "ideal" para esta aplicación, pero surgen problemas con limitaciones de tejido, traumatismos, infección y morbilidad del donante. Los aloinjertos tienen diversos problemas, incluyendo el riesgo de transmisión de enfermedades e inmunogenicidad. Tanto los autoinjertos como los aloinjertos muestran una pérdida de propiedades biológicas y mecánicas debido al remodelado secundario. Estas limitaciones han provocado interés por materiales alternativos a los injertos óseos (Parikh SN. 2002; J. Postgrad. Med. 48:142- 148).

15 El PMMA es un material polimérico no reabsorbible. Durante su polimerización, en el polímero quedan atrapados monómeros no reaccionados, catalizador y oligómeros de bajo peso molecular. Estas sustancias químicas pueden salir del material por filtración, provocando respuestas citotóxicas e inmunológicas localizadas. La polimerización de PMMA produce un fuerte efecto exotérmico que puede provocar necrosis por calor. Este efecto exotérmico también limita la capacidad del PMMA para incorporar cualquier agente farmacológico o quimioterapéutico. Una fuga de PMMA desde un defecto puede producir complicaciones muy graves, incluyendo compresión de estructuras adyacentes (que hacen necesaria una cirugía adicional) y/o embolia.

25 A escala nanoscópica (10^{-9} m), la matriz ósea está compuesta por fibras de colágeno con cristales minúsculos embutidos de sales de calcio. Para imitar la composición natural del hueso, con frecuencia se utilizan sales de calcio para reparar los huesos. Existe diversos "materiales de relleno de huecos inyectables" conocidos basados en sales de calcio. Una de las principales complicaciones de los cementos de sales cálcicas es la necesidad de un fraguado *in vivo*, que normalmente se logra por reacción química. Así, esto puede provocar el deterioro de cualquier material biológico incorporado en el material de relleno, como células y agentes farmacológicos. Además, si el material de relleno es demasiado "fluido", puede salir del defecto a los espacios adyacentes, produciendo una compresión de estructuras y posibles embolias. Las fugas de defectos cercanos a articulaciones pueden influir perjudicialmente en la función de éstas.

35 La sal de fosfato de calcio (CP) hidroxiapatita (HA estructura $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es la más parecida a la fase mineral del hueso y se puede sintetizar fácilmente en laboratorio. También es posible preparar una HA donde otros cationes (por ejemplo magnesio, sodio y estroncio) o aniones (cloruro, fluoruro y carbonato) están sustituidos en el cristal. En relación con la presente invención se trata de la sustitución de iones calcio (Ca^{2+}) por iones estroncio (Sr^{2+}) en los cristales de CP. Tanto el estroncio como el calcio pertenecen a los elementos alcalinotérreos y se parecen entre sí en que más del 99% del total del calcio y el estroncio del cuerpo está localizado en los huesos. El estroncio es el único elemento identificado que tiene una relación positiva con la resistencia ósea, es decir, la resistencia mecánica del hueso aumenta al aumentar el contenido de estroncio.

40 Los efectos terapéuticos potenciales del estroncio ya se conocen desde hace tiempo. Sin embargo, en la literatura se ha sugerido que el potencial terapéutico puede haber sido pasado por alto debido a la confusión del Sr^{2+} normal y estable (^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr y ^{88}Sr) con sus isótopos radiactivos (^{85}Sr , $^{86\text{m}}\text{Sr}$, ^{87}Sr y ^{89}Sr) (Dahl y col., Bone; 28 (4) pp. 446-453). Recientemente se han puesto de relieve los efectos terapéuticos del estroncio y las investigaciones han demostrado que ciertas sales de estroncio estimulan la osificación e inhiben la reabsorción ósea *in vitro* (incluso en dosis bajas) e *in vivo*, de acuerdo con una evaluación por histomorfometría ósea en roedores y pacientes osteoporóticos (Ferraro y col., 1983; Calcif Tissue Int. 35:258-60).

50 Los potentes efectos anabólicos y antirreabsorción del estroncio han conducido al desarrollo de un nuevo fármaco antiosteoporótico. Se ha demostrado que el fármaco oralmente activo (el principio activo es ranelato de estroncio) reduce el riesgo de fracturas vertebrales y aumenta la densidad mineral ósea (Meunier PJ y col., 2004; N Engl J Med. 350(5):459-68). El fármaco está compuesto por una molécula de ácido ranélico unida a dos átomos de estroncio. Se elige el grupo ranelato como vehículo porque se tolera bien en el tracto GI. En el intestino, el grupo ranelato libera los iones estroncio, lo que conduce a su absorción por la mucosa intestinal. Después de la absorción, el estroncio muestra una gran afinidad por el tejido óseo y se incorpora en la capa hidratada exterior de hidroxiapatita. Una cantidad menor se integra en el cristal óseo, donde la proporción del estroncio con respecto a los átomos de calcio no supera 1:10, de modo que la presencia de

- estroncio no altera la formación ni las propiedades fisicoquímicas del cristal. Se ha planteado que el ranelato de estroncio es la primera medicación que desacopla la osificación y la reabsorción ósea. *In vitro*, el ranelato de estroncio aumenta la síntesis de proteínas de colágeno y no colágeno, aumentando la diferenciación de preosteoblastos, inhibiendo la diferenciación de osteoclastos, reduciendo la función de osteoclastos y aumentando la apoptosis de osteoclastos. En modelos animales, el aumento de la densidad ósea tiene una estrecha correlación con el aumento de la resistencia biomecánica del hueso. En modelos de rata, el ranelato de estroncio aumenta la masa ósea y mejora la microarquitectura y la geometría ósea, lo que resulta en una mayor resistencia ósea. En ratas ovariectomizadas (un modelo de osteoporosis), el ranelato de estroncio disminuye la reabsorción ósea, pero mantiene una alta osificación. El tratamiento con ranelato de estroncio influye positivamente en todos los determinantes de la resistencia ósea (masa ósea, dimensión, microarquitectura y calidad intrínseca del tejido óseo). El incremento de las propiedades mecánicas del hueso se caracteriza por un aumento de la carga máxima, pero también por una mejora radical de la energía de ruptura, que se debe esencialmente a un aumento de la energía plástica (Kendler, 2006; Curr. Osteon. Rep. 4(1):34-9; Marie, 2006; Curr. Opin. Rheum. 18 Suppl1:S11-5; Ammann, 2006, Bone. 38(2 Suppl 1):15-8). Aunque el modo de acción del estroncio no se entiende por completo, se considera que el aumento de la osteogénesis no está asociado con cambios en los niveles de 1,25(OH)₂ vitamina D circulante o en efectos de la hormona paratiroidea. Se ha comprobado que el estroncio muestra una eficacia antifracturas en todos los sitios en una gran cantidad de mujeres posmenopáusicas (Close y col., 2006; Expert Opin Pharmacother 7(12):1603-15).
- Otros investigadores también han investigado la aplicación localizada de estroncio en forma de un cemento óseo con contenido en estroncio (Wong, Chi-Tak, 2004, "Osteoconduction and osseointegration of a strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement: in vitro and in vivo investigations." Editorial: Universidad de Hong Kong (Pokfulam Road, Hong Kong); Zhao y col., 2004; J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 69(1):79-86). El cemento óseo Sr-HA no reabsorbente estaba compuesto principalmente por material de relleno de hidroxiapatita con contenido en estroncio (Sr-HA) y resina dimetacrilato de diglicidil-éter bisfenol A (BIS-GMA). Se propuso que el material podría emplearse para vertebroplastia, ya que se podría suministrar por inyección y tener mejores propiedades físicas/mecánicas que el PMMA. Se demostró que el cemento óseo de hidroxiapatita con contenido en estroncio (Sr-HA) es bioactivo tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro* parecía ser más eficaz que un cemento óseo de hidroxiapatita no dopada (HA) para la unión celular (SaOS-2) y la mineralización ósea. *In vivo*, el cemento óseo de Sr-HA se unió con hueso natural.
- En las Patentes US nº 5. 736.132 y 5.549.904 se indica que un adhesivo tisular complementado con transglutaminasa contiene preferentemente un ion metálico divalente tal como calcio y estroncio en una cantidad entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 100 mM y con un pH entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,5. En dichos documentos se reivindica que el adhesivo complementado con transglutaminasa puede utilizarse en el tratamiento de tejidos en fracturas articulares, lesiones condrales, lesiones condrales superficiales, lesiones de espesor completo, osteocondritis disecante, roturas de menisco, roturas de ligamento, roturas de tendón, lesiones musculares, lesiones de uniones miotendinosas, trasplante de cartílago, trasplante óseo, trasplante de ligamento, trasplante de tendón, trasplante condral, trasplante condro-óseo, fijación de injerto de piel y vasos sanguíneos, injertos vasculares de parche y anastomosis de vasos sanguíneos. Las patentes se centran principalmente en la incorporación de la transglutaminasa en un adhesivo.
- En cambio, la presente invención no requiere transglutaminasa y está prevista para la inyección en defectos o huecos óseos para el suministro local de estroncio y para ayudar a la formación de hueso nuevo. Los datos de la literatura muestran que el estroncio elemental puede estimular la osificación y al mismo tiempo inhibir la reabsorción ósea.
- La presente invención proporciona una composición que puede ser inyectada en un defecto o hueco óseo o en el espacio medular de tejido óseo trabecular, donde sustituye temporalmente a la médula ósea, para ayudar a la formación de hueso nuevo. Los datos demuestran que el estroncio elemental puede estimular la osificación y al mismo tiempo inhibir la reabsorción ósea.
- En un aspecto, la invención proporciona una composición para su uso en la cicatrización y el crecimiento óseo, comprendiendo dicha composición fibrina, trombina y un compuesto con contenido en estroncio. La composición puede comprender además un compuesto con contenido en calcio. Preferentemente, la composición es una composición inyectable en forma de gel inyectable, masilla inyectable, pasta inyectable o líquido inyectable.
- En otras realizaciones, la composición puede comprender uno o más agentes plastificantes. En determinadas realizaciones, el plastificante es un compuesto con contenido en yodo. Ejemplos con contenido en yodo útiles aquí como plastificantes incluyen, de forma no exclusiva, compuestos seleccionados de entre el grupo consistente en diatrizoato, iodecol, iodixanol, iofratol, iogulamida, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopromida,

- iotrol, ioversol, ioxagulato y metrizamida, y mezclas de los mismos y alcoholes polivalentes. En otras realizaciones, el plastificante es un polietilenglicol, un alcohol polivalente, glicerol, o un azúcar seleccionado entre el grupo consistente en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el efecto plastificante se logra mediante el ajuste de la composición de compuestos de bajo peso molecular tales como, entre otros, cloruro de sodio y agentes caotrópicos.
- La composición puede estar en forma de gel o líquido. En determinados aspectos, la composición se puede suministrar en forma de líquido o gel antes de la fase de gelificación o durante la misma, o en forma de gel preformado, a defectos tisulares.
- En otros aspectos de la invención, la composición contiene una o más proteínas extracelulares seleccionadas de entre el grupo consistente en proteínas de matriz, como fibronectina, proteínas asociadas a células o proteínas derivadas de plasma, como factor de coagulación sanguínea XIII y proteasas.
- En otras realizaciones, la composición puede comprender además un agente inductor de la coagulación, como protamina, veneno de serpiente, FXIIa o un sistema tampón alcalino fisiológicamente aceptable.
- En realizaciones específicas, la composición es reabsorbida y sustituida por tejido durante el proceso de cicatrización.
- El componente que contiene estroncio utilizado en las composiciones de la invención puede ser una sal cálcica sustituida con un 25% de estroncio.
- La composición puede ser una composición que además incluye un coligando de estroncio seleccionado de entre el grupo consistente en grupos calcimiméticos, osteocalcina, aminoácidos como L-arginina y arginoniméticos y análogos de arginina.
- En las composiciones aquí descritas, el compuesto con contenido en estroncio y el compuesto con contenido en calcio pueden estar en forma de (micro)partículas o en forma sólida. En algunos ejemplos de realización, las (micro)partículas que contienen estroncio o calcio tienen un diámetro que oscila entre 100 nanómetros y 500 µm. En otras realizaciones, los componentes que contienen estroncio o calcio pueden adoptar la forma de sólidos porosos o no porosos con dimensiones que oscilan, por ejemplo, entre 0,5 y 50 milímetros. Preferentemente, el tamaño de partícula oscila entre 0,5 y 5 milímetros.
- En realizaciones específicas, el compuesto que contiene calcio es un fosfato de calcio. El fosfato de calcio se puede seleccionar de entre el grupo consistente en fosfato tricálcico, fosfato alfa-tricálcico, fosfato beta-tricálcico, polimorfos de fosfato de calcio, hidroxiapatita, carbonato de calcio, sulfato de calcio y combinaciones de los mismos.
- De acuerdo con la presente invención, parte del calcio se sustituye por estroncio para proporcionar una mezcla de sales de calcio y estroncio.
- De acuerdo con la presente invención, la proporción o porcentaje entre las sales de estroncio y las sales de calcio es del 25%. En determinadas realizaciones, las composiciones de la invención pueden comprender además una proteína o una combinación de proteínas seleccionadas de entre el grupo consistente en proteínas morfogenéticas óseas, hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, bisfosfonatos, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de tipo insulina y factores de crecimiento TGF. Se puede utilizar cualquier proteína que tenga un efecto promotor del crecimiento óseo o de aumento de hueso.
- En ciertas realizaciones, la composición es tal que al mezclar los diversos componentes se produce su gelificación.
- En realizaciones preferentes, los métodos que utilizan la composición de la invención comprenden tratar huesos enfermos, lesionados o deficientes en un ser vivo, inyectando en el hueso esponjoso de dicho sujeto una composición que incluye una composición que contiene estroncio de la presente invención. Ventajosamente, la inyección de dicha composición en el hueso esponjoso del sujeto produce una velocidad de cicatrización más rápida que la observada en el caso de la administración de una composición similar que no contiene estroncio.
- Aquí también se contempla un método para reparar un hueso que presenta un defecto y que comprende: (a) fijar mecánicamente el hueso o partes del mismo; y (b) rellenar el defecto con una composición de la invención en una cantidad eficaz para producir la reparación de dicho defecto. En realizaciones ilustrativas, el defecto es una fractura ósea y dicha reparación consiste en la cicatrización ósea de dicha fractura. En aspectos específicos, la aplicación de dicha composición produce una velocidad de cicatrización que es más rápida que la observada en ausencia de aplicación de dicha composición. Preferentemente, la aplicación de

dicha composición produce una velocidad de cicatrización que es más rápida que la observada con la aplicación de una composición similar que no contiene estroncio.

- 5 Aquí también se contempla un método para promover el crecimiento de hueso nuevo en el sitio de un defecto óseo, que comprende poner en contacto dicho sitio del defecto con una composición de la invención. Preferentemente, la velocidad de dicho crecimiento óseo es más rápida en presencia de estroncio en dicha composición en comparación con el crecimiento óseo observado en presencia de una composición similar que no contiene estroncio.

Breve descripción de las figuras:

- 10 Fig. 1: muestra la proliferación celular en caso de de células de tipo osteoblasto humano (SaOS-2) desarrolladas en coágulos que contienen estroncio. La notación utilizada es Ca/Sr. Los valores indicados son las concentraciones en el coágulo final. Para alcanzar estas concentraciones en el coágulo final, la concentración en el tampón se duplica.
- 15 Fig. 2: muestra un ensayo de ADN en caso de células de tipo osteoblasto humano (SaOS-2) desarrolladas en coágulos que contienen estroncio. La notación utilizada es Ca/Sr. Los valores indicados son las concentraciones en el tampón. Este valor se divide por la mitad en el coágulo final.
- 20 Fig. 3: muestra la producción de fosfatasa alcalina durante 30 minutos en caso de células de tipo osteoblasto humano (SaOS-2) desarrolladas en coágulos que contienen estroncio. Los valores indicados son las concentraciones en el coágulo final. Para lograrlo, la concentración en el tampón se duplica.
- Fig. 4: muestra análisis turbidimétricos de coágulos, para los que el tampón de trombina está formado por calcio, una mezcla de calcio/estroncio o estroncio solo. La notación utilizada es Ca/Sr. Los valores indicados son las concentraciones en el tampón. Este valor se divide por la mitad en el coágulo final.
- 25 Fig. 5: muestra la supervivencia porcentual (medida mediante ensayo de proliferación MTS) en caso de coágulos desarrollados en medios que contienen 12,5 mM de Sr o Ca.
- Fig. 6: muestra la tinción de células NHOst cultivadas en coágulos de fibrina y coágulos de fibrina que contienen partículas de estroncio: tinción de células vivas (cuadro izquierdo) y muertas (cuadro derecho) de células NHOst cultivadas en coágulos de fibrina durante 14 días (cuadro superior) o coágulos de fibrina que contienen partículas de estroncio (cuadro inferior).
- 30 Fig. 7: muestra secciones transversales de coágulos de fibrina cultivados con células NHOst. Las células se tiñen de verde (vivas) y rojo (muertas). Cuadro superior coágulo de fibrina. Cuadro inferior coágulos de fibrina que contienen partículas.
- 35 Fig. 8: una representación gráfica de perforaciones completamente cerradas (ambos lados están cerrados).
- Fig. 9: muestra el μ CT de un cóndilo femoral de conejo en presencia de fibrina en el material.
- Fig. 10: una representación gráfica de la osificación (evaluación: 1: osificación baja; 2: osificación media; 3: osificación alta).
- 40 Fig. 11: μ CT de un cóndilo femoral de conejo con un 80% de material de Sr.
- Fig. 12: una sección delgada teñida histológica de un defecto de cóndilo femoral de conejo tratado con fibrina.
- Fig. 13: una sección delgada teñida histológica de un defecto de cóndilo femoral de conejo tratado con Sr 80% en un coágulo de fibrina.
- Fig. 14: muestra la influencia de SrCl_2 en la bioactividad de PTH.

- 45 La presente invención se refiere a una composición que comprende fibrinógeno, trombina y un compuesto que contiene estroncio en una forma insoluble o soluble y/o como un particulado inorgánico, que puede o no contener un plastificante de fibrina, para su uso en la cicatrización y el crecimiento óseos. La alteración de las cantidades de trombina o del contenido de particulado inorgánico permite controlar el período de gelificación según imponga la aplicación o el tejido diana. Puede emplearse un plastificante de fibrina o un agente modificador para mejorar las propiedades mecánicas de la formulación o para retrasar además el tiempo de coagulación. Ejemplos de plastificantes incluyen agentes de contraste con contenido en yodo, como diatrizoato, iodecol, iodixanol, iofratol, iogulamida, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopromida, iotrol, ioversol, ioxagolato y metrizamida y mezclas de los mismos y alcoholes polivalentes.
- 50

- 55 La composición se puede suministrar en forma de líquido antes de la fase de gelificación o durante la misma o en forma de gel preformado en defectos tisulares utilizando una técnica mínimamente invasiva. Está previsto que la formulación sea reabsorbida y sustituida por tejido durante el proceso de cicatrización.

La solución de fibrinógeno es una solución acuosa con fibrinógeno que oscila entre 5 y 200 mg/ml, preferentemente entre 50 y 100 mg/ml. La solución de fibrinógeno también puede incluir proteínas de matriz

extracelulares (por ejemplo fibronectina, proteínas asociadas a células, otras proteínas derivadas de plasma [por ejemplo factor de coagulación sanguínea XIII y proteasas]). La solución de fibrinógeno también puede incluir monómero de fibrina, derivados y fibrina I.

- 5 El componente de trombina también puede comprender compuestos adicionales conocidos en la técnica, así como el compuesto de estroncio. No hay ninguna limitación específica con respecto a la cantidad de trombina utilizada. En un ejemplo de la presente invención, la cantidad de trombina es tal que es de al menos aproximadamente 1 IU/ml en la composición coagulada final hasta la cantidad de 30 IU/ml.

- 10 En lugar de o además de trombina, la presente invención puede incluir otros agentes inductores de la gelificación o de la coagulación para el componente a), como protamina, veneno de serpiente, transglutaminasas, FXIIa, un sistema tampón alcalino fisiológicamente aceptable.

El tampón de trombina es una solución acuosa que contiene un catión divalente, entre otras sustancias. La concentración del catión divalente en el tampón puede oscilar entre 5 y 50 mM.

- 15 Preferentemente, los cationes divalentes se seleccionan entre grupos de calcio y estroncio y la relación puede oscilar entre 0:1 y 0,975:0,025. Los iones de estroncio divalente se pueden añadir en forma de cloruro de estroncio o cualquier otra sal de estroncio soluble en agua, tal como ranelato de estroncio, glutamato de estroncio, aspartato de estroncio, malonato de estroncio, maleato de estroncio, ascorbato de estroncio, treonato de estroncio, lactato de estroncio, piruvato de estroncio, alfa-cetoglutarato de estroncio o succinato de estroncio. El tampón de trombina también puede contener coligandos para una diana molecular de estroncio recién identificada (un receptor acoplado a proteína G receptor sensor de calcio, Pi y col., J. Biol. Chem. 2005). Los coligandos se seleccionan entre los grupos calcimiméticos, osteocalcina y aminoácidos, preferentemente L-arginina, arginomiméticos o análogos de arginina. El tampón de trombina con contenido en estroncio también puede emplearse junto con las partículas inorgánicas que contienen estroncio.
- 20

- 25 El componente particulado tiene un diámetro de partícula que oscila entre nanómetros y menos de 3.000 µm y debería ser insoluble en el momento de la aplicación. Preferentemente, el tamaño de partícula oscila entre 100 nanómetros y 50 milímetros y de forma especialmente preferente entre 0,5 mm y 50 mm. Las partículas pueden ser sales de calcio sustituidas por estroncio que son insolubles en el momento de la aplicación. La sal de calcio para la sustitución se puede seleccionar de entre el grupo consistente en fosfatos de calcio, fosfatos tricálcicos, fosfato alfa-tricálcico, fosfato beta-tricálcico, polimorfos de fosfato de calcio, hidroxiapatita, carbonato de calcio, sulfato de calcio y combinaciones de los mismos. La sustitución con calcio de las partículas por estroncio es del 25%. La mezcla para obtener el gel final se puede lograr en un intervalo de temperaturas de 18-37°C, preferentemente a 37°C.
- 30

- La solución de fibrinógeno es una solución acuosa de fibrinógeno que oscila entre 5 y 200 mg/ml, preferentemente entre 50 y 100 mg/ml. La solución de fibrinógeno también puede incluir monómero de fibrina, derivados y fibrina I. La solución de fibrinógeno también puede incluir proteínas de matriz extracelular, por ejemplo fibronectina, proteínas asociadas a células, y otras proteínas derivadas de plasma, como factor de coagulación sanguínea XIII (FXIII) y proteasas.
- 35

La solución de trombina es una solución acuosa con una concentración final mínima de 0,1 IU/ml en la composición final coagulada (o gelificada). Esta solución también puede estar tamponada y contener aminoácidos, proteínas o aditivos (por ejemplo L-arginina, manitol y albúmina).

- 40 El contenido de partículas en la composición oscila entre el 2 y el 100%, preferentemente entre el 30 y el 50% (peso/volumen) de proteínas coagulables. El componente particulado tiene un diámetro de partícula en el intervalo entre submicras y menos de 3.000 µm, según requiera la aplicación. La homogeneización para obtener el gel final se puede lograr en un intervalo de temperaturas de 18-37°C, preferentemente a 37°C.

- 45 La eficacia de las composiciones de la presente invención para ayudar a la reparación ósea se puede mejorar adicionalmente incorporando moléculas bioactivas. Éstas se pueden unir químicamente a la matriz, adsorber sobre un componente particulado o quedar atrapadas en la matriz de fibrina como molécula libre o como un fármaco en polvo. Estas moléculas se pueden utilizar para estimular el metabolismo óseo (anabolismo o catabolismo). Moléculas adecuadas que han sido identificadas incluyen proteínas morfogenéticas óseas (BMP), hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, bisfosfonatos, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de tipo insulina y la superfamilia de factores de crecimiento TGF. Las moléculas adecuadas también pueden incluir otros factores no relacionados con el ciclo de anabolismo/catabolismo óseo, sino relacionados con procesos fisiológicos que se producen en paralelo a la reparación/remodelación ósea, por ejemplo también se pueden incorporar estimuladores angiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y factores de crecimiento derivados de plaquetas [PDGF]). Esto es particularmente interesante, ya
- 50

que se cree que el modo de acción del estroncio es independiente de los agentes anabólicos 1,25(OH)₂ vitamina D y paratiroides.

5 También es posible mezclar un plastificante con la fibrina o trombina para mejorar las propiedades mecánicas de la formulación o retrasar adicionalmente el tiempo de coagulación. Ejemplos de plastificantes se seleccionan entre el grupo consistente en agentes de contraste con contenido en yodo solubles en agua, polietilenglicoles, alcoholes polivalentes tales como glicerol, mono-, di-, tri- y polisacáridos, y cualquier combinación de los mismos. En la solicitud de patente US 20050119746 (Lidgren y Nilson, 2004) se detallan medios de contraste con contenido en yodo adecuados, que son por ejemplo diatrizoato (meglumina), iodecol, iodixanol, iofratol, iogulamida, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopromida, iotrol, ioversol, ioxagato y metrizamida. Preferentemente, el agente de contraste es no iónico, tiene una baja osmolaridad y permite que se produzca la agrupación de fibrina (por ejemplo iodixanol).

15 Las composiciones de la presente invención se pueden emplear en métodos útiles de cicatrización ósea y en kits a utilizar con dichos métodos. Está previsto que la composición pueda utilizarse para promover el crecimiento o la cicatrización ósea, en especial en caso de huesos largos. Específicamente, la presente invención se refiere a una composición de reparación ósea que contiene trombina, fibrina, hormona paratiroidea (PTH) y estroncio. La presencia de estroncio en la composición conduce a una mejor cicatrización y/o generación ósea en comparación con una composición de este tipo que no contiene estroncio.

20 Las composiciones de la invención pueden emplearse en la reparación y regeneración de huesos largos, como el fémur, la tibia, el húmero, el radio, el cúbito y similares.

Mediante el uso de las composiciones de la presente invención será posible restaurar o restaurar parcialmente la competencia mecánica, arquitectónica y estructural de huesos que presentan defectos, proporcionando al mismo tiempo áreas superficiales estructurales que pueden servir como sustratos apropiados para el proceso biológico que rige la cicatrización y regeneración ósea.

25 Como muestran los ejemplos, la composición de la invención acelera los procesos celulares y biológicos que intervienen en la reparación ósea.

30 Tal como se utiliza más adelante, el concepto "hueso largo" se refiere a un hueso que tiene una longitud al menos dos veces mayor el diámetro. Normalmente, el concepto "hueso largo" se refiere a huesos de las extremidades, esto es, tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, carpos, metacarpos, falanges, tarsos y metatarsos. Más específicamente, el concepto "hueso largo", tal como se utiliza aquí, se refiere a los cuatro huesos principales de las extremidades, es decir, tibia, fémur, húmero y radio.

35 El "defecto óseo" que puede ser remediado mediante el uso de las composiciones de la presente invención puede consistir en cualquier anomalía ósea, incluyendo, de forma no exclusiva, huecos, cavidades, discontinuidades conformacionales, fracturas o cualquier cambio estructural producido por lesión, osteotomía, cirugía, fracturas, cicatrizaciones con malformación, fracturas no unidas, deformaciones esqueléticas, envejecimiento o enfermedad. Las composiciones de la presente invención tienen un importante potencial terapéutico. Cuando un hueso esponjoso enferma, por ejemplo debido a osteoporosis, necrosis avascular o cáncer, el hueso cortical circundante es más propenso a fracturas por compresión o colapso. Esto se debe a que el hueso esponjoso ya no proporciona soporte interior para el hueso cortical circundante. Las composiciones de la invención pueden emplearse para reforzar huesos en condiciones tales como osteoporosis, osteonecrosis o necrosis avascular, y otras enfermedades óseas que impliquen infección del hueso, mala cicatrización ósea o un hueso fracturado por traumatismo grave.

45 Aquí se describe un kit para reparar un hueso que presenta un defecto. El kit incluye un dispositivo de fijación mecánica para fijar el hueso o partes del mismo, y composiciones de la presente invención. Ejemplos de dispositivos de fijación incluyen, de forma no exclusiva, bridas, varillas, barras, alambres, grapas, tornillos, suturas y diversos moldes, manguitos y similares, que son normalmente dispositivos de fijación externa. Por tanto, el kit incluye preferentemente un dispositivo de fijación mecánica externa.

50 Aquí se describe un método para tratar defectos óseos, como fracturas, cavidades, huecos y similares, que consiste en ponerlos en contacto con una composición de la presente invención. En algunas realizaciones, el método puede implicar la fijación mecánica del hueso o partes del mismo antes o después de un paso consistente en poner en contacto el defecto con una composición de la presente invención.

55 Ventajosamente, las composiciones de la presente invención pueden emplearse como composiciones inyectables que se introducen en un defecto o hueco óseo (de hueso) o en el espacio medular de tejido óseo trabecular, sustituyendo la composición temporalmente la médula ósea, y/o como ayudas en la formación de nuevo hueso. Las composiciones se pueden inyectar en tejido óseo trabecular o en cualquier tejido óseo

utilizando técnicas bien conocidas por los especialistas. Ejemplos de estas técnicas y aparatos para poner en práctica las mismas se describen, por ejemplo, en la publicación de Patente US nº 20080065091, la publicación de Patente US nº 20080058828, la publicación de Patente US nº 20070073307 y las Patentes US nº 4.969.888 y 5.108.404, entre otras. Normalmente, para inyectar las composiciones en el hueso se utilizan dispositivos de inyección similares a una pistola doméstica para sellar. Un dispositivo de inyección de cemento óseo típico tiene un cuerpo en forma de pistola que soporta un cartucho que contiene cemento óseo. Un gatillo acciona un pistón sometido a la carga de un muelle, que empuja un volumen de cemento óseo en estado viscoso a través de una boquilla apropiada y hasta el interior de un hueso para el que está previsto el tratamiento. De acuerdo con las enseñanzas de las Patentes US nº 4.969.888 y 5.108.404, primero se puede formar una cavidad compactando hueso esponjoso dentro del hueso, en la que después se inyecta el cemento óseo.

Una ventaja añadida de la incorporación del Sr en las composiciones inyectables de la invención es que permite controlar el proceso de suministro y cicatrización utilizando técnicas como la fluoroscopia, gracias a las propiedades conocidas del estroncio como opacificador de radio. Como tal, el uso del Sr en las composiciones de la presente invención proporciona tanto una función terapéutica como una función diagnóstica y no simplemente una función exclusivamente de formación de imágenes.

Las composiciones de la presente invención pueden emplearse en forma de gel inyectable, pasta inyectable, pasta, masilla o en forma liofilizada rehidratable. Tal como se utiliza aquí, el término "gel" se refiere a una sustancia gelatinosa, espesa, blanda y parcialmente líquida. Un gel de la presente invención se puede extrudir a través de una aguja de jeringuilla al menos de calibre 13. Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "pasta" se refiere a una sustancia blanda y húmeda que tiene una consistencia entre líquido y sólido. Una pasta de la presente invención es menos sólida que una masilla y más sólida que un gel, y en algunas realizaciones puede ser inyectable.

El término "masilla" se refiere a una composición de reparación tisular de la presente invención similar a una masa/arcilla. Durante la aplicación, la sustancia se puede batir o amasar hasta que adquiere la consistencia de una masa y moldear en una forma muy parecida a la del sitio de implante.

El término "inyectable" se refiere a la capacidad de la presente invención para ser introducida a presión en un sitio de implante (por ejemplo introducción con una jeringuilla). Una composición inyectable de la presente invención se puede introducir por ejemplo entre elementos o en un espacio cerrado *in vivo* (es decir, entre partes de hueso o en la superficie de separación entre un dispositivo protésico y hueso, entre otros).

El término "jeringuilla" se refiere a cualquier dispositivo que pueda ser utilizado para inyectar o retirar composiciones de reparación de tejido fluidas de la presente invención, incluyendo determinados geles y pastas, entre otras.

La composición se inyecta en hueso cortical o hueso trabecular de un sujeto (el sujeto es preferiblemente un sujeto humano, simio, ovino, bovino, equino, porcino). Tal como se utiliza en la presente solicitud, el concepto "hueso cortical" se refiere al hueso compacto de la diáfisis de un hueso que rodea la cavidad medular. El hueso cortical es una estructura sumamente densa compuesta por hebras de triple hélice de fibra de colágeno, reforzadas con hidroxapatita. El hueso cortical es una estructura compuesta y es el principal componente de soporte de carga de los huesos largos en el cuerpo humano. El componente de hidroxapatita es responsable de la alta resistencia a la compresión del hueso, mientras que el componente de fibra de colágeno contribuye en parte a la resistencia a la torsión y la tensión. Las composiciones de la invención se pueden introducir en estas partes de hueso para impartir un efecto beneficioso de cicatrización ósea o aumento óseo.

El hueso trabecular tiene una composición similar a la del hueso cortical y es el principal componente estructural del "hueso esponjoso", y se refiere a un hueso adulto consistente en fibras de colágeno paralelas mineralizadas ordenadas regularmente y con una organización diferente a la del hueso laminar de la diáfisis de huesos largos de adulto. El hueso esponjoso se encuentra generalmente en el extremo de huesos largos rodeado por hueso cortical. El hueso esponjoso tiene espículas que forman un entramado con intersticios rellenos de médula ósea. También se puede denominar como hueso trabecular o hueso esponjoso. En realizaciones preferentes, las composiciones de la invención se introducen en hueso trabecular.

Los métodos de fijación de hueso aquí descritos también pueden incluir el paso de remodelación del defecto antes de la fijación del hueso o el contacto con la composición de la invención. Esta remodelación o realineación ósea se puede llevar a cabo, por ejemplo, con taladros o amoladoras o cualquier otro dispositivo utilizado para remodelar el defecto.

El dispositivo utilizado para fijar el hueso dependerá del tipo de defecto a reparar y del tipo de hueso y su situación. Normalmente, el dispositivo de fijación es un dispositivo de fijación externa. Preferentemente, el único dispositivo de fijación utilizado en el método es un dispositivo de fijación externa, por ejemplo un molde, acompañado de una inyección de la composición de la presente invención. No obstante, en algunas circunstancias será necesario emplear procedimientos quirúrgicos más invasivos utilizando un dispositivo de fijación interno, que también puede ser empleado.

La reparación se puede controlar y el dispositivo empleado para fijar el hueso se puede retirar a su debido tiempo. La regeneración ósea en el sitio del defecto se puede evaluar por imágenes de rayos X de tejidos blandos (7,5 mA; 0,5 segundos) tomadas inmediatamente a continuación de la cirugía y a intervalos de tiempo determinados después de la cirugía. La regeneración ósea en animales de ensayo también se puede determinar después de finalizar los experimentos mediante evaluación de la morfología general, exploración por topografía computerizada (CT) (65-80 kV; 20 segundos) y exploración por CT tridimensional (3-D) (Marconi. M.times.8,000). Para determinar la tinción ósea del tejido se pueden realizar estudios histológicos.

En los métodos aquí descritos, las composiciones también se pueden combinar con células que pueden ser utilizadas en la reparación ósea, por ejemplo células osteoprogenitoras. Como es sabido en la técnica, las células osteoprogenitoras incluyen una subpoblación osteogénica de las células estromales de la médula, caracterizadas como células formadoras de hueso. Las células osteoprogenitoras utilizadas por el método aquí descrito pueden incluir células osteogénicas formadoras de hueso de por sí y/o células madre embrionarias que forman células osteoprogenitoras. Las células osteoprogenitoras se pueden aislar por procedimientos conocidos. Estas células proceden preferentemente de una fuente autóloga e incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias humanas, células osteoprogenitoras de ratón o humanas, células derivadas de médula osteoprogenitora de ratón o humana, células derivadas de células embrionarias osteoprogenitoras de ratón o humanas y células embrionarias de ratón o humanas. Estas células pueden servir además como células segregadoras de factores de crecimiento, tal como describen Robinson y Nevo (2001), que se han definido más arriba.

La composición de la presente invención también puede comprender diversos principios activos terapéuticos, que pueden incluir agentes promotores del crecimiento óseo, células osteoprogenitoras o una combinación de los mismos. Las composiciones pueden incluir al menos un fármaco, como una vitamina, un antibiótico, un antiinflamatorio y similares.

De acuerdo con la presente invención, el estroncio se incorpora en una sal que contiene calcio utilizando técnicas conocidas por los especialistas para preparar compuestos de calcio sustituidos con estroncio.

Un "vidrio bioactivo" es cualquier vidrio que presente características de bioactividad, normalmente se trata de un sólido amorfo que no es intrínsecamente adhesivo y que puede formar una unión cohesiva tanto con tejido blando como con tejido duro al ser expuesto a entornos apropiados *in vivo* e *in vitro*, como fluido biológico simulado o tampones tris-hidroximetilaminometano. Se consigue una unión cohesiva desarrollando una capa superficial de hidroxicarbonato apatita sobre el vidrio bioactivo mediante la liberación de especies iónicas de la masa de material de biovidrio. Existen numerosas aplicaciones para los vidrios bioactivos en el campo de los tratamientos quirúrgicos y ortopédicos, así como en la cirugía dental, y se describen, por ejemplo, en la Patente Europea 1 405 647 y la Solicitud de Patente Europea 1 655 042, así como en las solicitudes internacionales WO 96/21628, WO 91/17777, WO 91/12032 y la publicación de Patente US número 20080066495.

Ejemplos

En una realización aquí descrita, el compuesto que contiene estroncio se utiliza como el ion divalente en un tampón de dilución de trombina. La solución de trombina se prepara utilizando el tampón de dilución. La solución de fibrinógeno y la solución de trombina con contenido en estroncio se mezclan formando un gel.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto que contiene estroncio se añade a la formulación en forma de una partícula de sal. La solución de trombina y las partículas se mezclan para preparar la solución de trombina modificada. La solución de fibrinógeno y la solución de trombina modificada se mezclan para formar un gel.

50 Ejemplo I: Compuesto que contiene estroncio disuelto en la solución tampón

Se prepararon diversos tampones en agua bidestilada. Para estos tampones, el catión divalente en el tampón de trombina era Ca o una mezcla de Ca + Sr, de modo que la concentración de cationes se mantuvo constante en 40 mM (véase la tabla más abajo para el cloruro de estroncio). La trombina se diluyó a una concentración de 4 IU en el tampón de trombina.

CaCl ₂ 40 mM	CaCl ₂ 30 mM	CaCl ₂ 20 mM	CaCl ₂ 10 mM	CaCl ₂ 0 mM
SrCl ₂ 0 mM	SrCl ₂ 10 mM	SrCl ₂ 20 mM	SrCl ₂ 30 mM	SrCl ₂ 40 mM

Después, el fibrinógeno se mezcló con trombina en una proporción 1:1 (por lo tanto, la concentración de estroncio en el coágulo gelificado se dividió por la mitad). Para ello, 2 ml de la solución de trombina se pueden transferir a una jeringuilla de 5 ml. En otra jeringuilla de 5 ml se introdujeron 2 ml de fibrinógeno (Tisseel, Baxter, Clottable Protein, [fibrinógeno y fibronectina] 72-110 mg/ml). Las jeringuillas que contenían el fibrinógeno y la trombina se pueden conectar a cualquier mezcladora del estado actual de la técnica para combinar sus contenidos.

Para los experimentos *in vitro*, los coágulos se prepararon transfiriendo con pipeta 150 µl de la solución de fibrinógeno a los pocillos de una placa de 24 pocillos. La placa se dispuso sobre un agitador de placas para asegurar una distribución uniforme sobre el fondo del pocillo. Después se añadieron 150 µl de la solución de trombina al pocillo y la placa se dispuso sobre un agitador de placas para asegurar coágulos homogéneos. Una línea celular similar a osteoblastos humanos (SaOS-2) se cultivó sobre los coágulos durante hasta 7 días para ver si se podía observar alguna diferencia en la proliferación celular/diferenciación celular. La Figura 1 muestra los resultados de la proliferación (azul Alamar) cuando se añade cloruro de estroncio (SrCl₂) al tampón de dilución de trombina. Unos resultados similares están disponibles en el caso del acetato de estroncio (SrAc).

El ensayo de azul Alamar es un ensayo metabólico frecuentemente utilizado para medir la proliferación. La adición de estroncio resultó en un aumento significativo de la proliferación de estos coágulos en comparación con un coágulo normal con CaCl₂ 20 mM. También se observó un resultado similar cuando la proliferación se cuantificó utilizando una tinción de ADN (Figura 2). Después de 7 días se pudieron observar diferencias claras entre células desarrolladas sobre coágulos que contenían una mezcla de calcio y estroncio o solo calcio. Por tanto, se llegó a la conclusión de que el estroncio tenía un efecto positivo en la proliferación de osteoblastos como células SaOS-2.

Estos experimentos iniciales estaban diseñados para observar diferencias en la proliferación celular, pero no proporcionan tiempo suficiente para investigar la diferenciación de osteoblastos. La enzima fosfatasa alcalina es un indicador temprano de diferenciación, pero los niveles realmente no alcanzan valores máximos hasta aproximadamente los días 10-14. Un resultado preliminar muestra un incremento en la expresión de la fosfatasa alcalina en los coágulos que contienen estroncio (Figura 3). En el caso del acetato de estroncio, estos valores parecen no ser significativos. Estos experimentos se repiten con un período de investigación de 14 días.

Además de la observación de los estudios celulares, se llevaron a cabo análisis turbidimétricos para examinar si la estructura del coágulo se alteraba a consecuencia del estroncio (Figura 4). La turbidez del coágulo es directamente proporcional al área media de la sección transversal de las fibras, por lo que cuanto más turbio es el coágulo, mayor es el diámetro de las fibras.

Los datos de turbidimetría de la Figura 4 muestran que hay muy poca diferencia en la cinética y la absorbencia en el caso de los coágulos con contenido de estroncio en comparación con los coágulos con contenido de calcio. Esto se puede explicar por observaciones de que el calcio y el estroncio pueden ocupar sitios de unión similares, en particular el sitio de unión de FXIII.

Para los experimentos iniciales se sembraron células sobre la superficie de los coágulos. Una de las razones para elegir este método de siembra es que ciertos tipos de células, cuando se siembran dentro de los coágulos, experimentan en gran medida muerte celular y se produce una migración de las células a la superficie del coágulo. Una posible explicación de este efecto se puede dar cuando se cultivan células similares a osteoblastos en un medio complementado con CaCl₂. La Figura 5 muestra los resultados del cultivo de células SaOS-2 sobre plástico de cultivo tisular en presencia de CaCl₂ 12,5 mM. En el caso de las células cultivadas en presencia de cloruro de calcio se produce muerte celular (medida mediante un ensayo MTS). Esto ocurre durante las primeras 24 horas del cultivo celular. En cambio, en el caso de las células cultivadas en presencia de compuestos con contenido en estroncio sólo se produce una ligera reducción de su proliferación. Es importante señalar que algunas células requieren una alta proporción de calcio (es decir, fibroblastos y queratinocitos) y, por lo tanto, no resultarían afectadas por la concentración de calcio del coágulo.

Ejemplo 2: Nanopartículas de fosfato de calcio dopadas con fibrina/estroncio

La trombina se diluyó a una concentración de 4 IU en el tampón de trombina. El fibrinógeno se mezcló con trombina en una proporción 1:1. Para ello, 2 ml de la solución de trombina se pueden transferir a una

jeringuilla de 5 ml. Dos ml de fibrinógeno (Tisseel, Baxter, Clottable Protein, [fibrinógeno y fibronectina] 72-110 mg/ml) se transfirieron a otra jeringuilla de 5 ml. Las partículas (nanopartículas de menos de 1 µm) se incorporan como un peso porcentual del volumen de coágulo final (p/v). Éstas se pesan y se introducen en otra jeringuilla de 5 ml.

- 5 Las jeringuillas que contienen las partículas y la trombina se conectan a través de un adaptador Luer y la trombina y las partículas se homogeneizan transfiriendo los contenidos de una jeringuilla a la otra. Las jeringuillas que contienen la trombina/partículas y el fibrinógeno se conectan con un adaptador Luer y sus contenidos se homogeneizan. El material se mantiene en estado líquido durante aproximadamente 30 segundos y durante este tiempo se puede inyectar en el defecto.
- 10 Para los experimentos *in vitro*, los coágulos se preparan transfiriendo con pipeta 150 µl de la solución de fibrinógeno a los pocillos de una placa de 24 pocillos. Las partículas (nanopartículas de menos de 1 µm) se añaden como un peso porcentual del volumen de coágulo final (p/v). La placa se dispone sobre un agitador de placas para asegurar una distribución uniforme sobre el fondo del pocillo. Después se añaden 150 µl de la solución de trombina al pocillo y la placa se dispone sobre un agitador de placas para asegurar coágulos homogéneos. En los estudios preliminares se cultivaron células similares a osteoblastos humanos (SaOS-2 o NHOst) sobre los coágulos durante hasta 14 días para ver si se podía observar alguna diferencia en la proliferación celular y la diferenciación celular.
- 15

- 20 Los análisis cualitativos de las células sembradas sobre los coágulos que contienen partículas muestran una buena biocompatibilidad en comparación con los coágulos de fibrina normales (Figura 6). Aunque no se ha cuantificado, parece que las células sobre los coágulos de fibrina sin partículas presentan una morfología más redondeada, mientras que las células sobre los coágulos que contienen partículas están más extendidas. En secciones transversales de los coágulos (Figura 7) se puede ver otra prueba de ello. Con este fin se sembraron células en los coágulos. Unos días después, las células de los coágulos de fibrina migraron a la superficie del coágulo. En comparación, las células en los coágulos que contienen partículas permanecían dentro de los coágulos y se dispersaron mostrando una morfología favorable.
- 25

Ejemplo 3: Utilización de hidroxiapatita dopada con estroncio en un modelo de defecto de cóndilo femoral de conejo

- 30 Los estudios arriba descritos sugieren que el estroncio estimula la formación de hueso y al mismo tiempo reprime la reabsorción ósea. En algunos estudios anteriores se investigó el efecto del SrCl₂ en células similares a osteoblastos y en osteoblastos primarios. Durante el intento de identificación de una formulación que pudiera ser utilizada en el aumento vertebral, se dopó una hidroxiapatita modificada con estroncio y se ensayó en un modelo de defecto de cóndilo femoral de conejo para evaluar el potencial del estroncio para estimular la formación de hueso. La hidroxiapatita de calcio se puede producir en laboratorio agitando nitrato de calcio y fosfato de amonio juntos a un pH alto (ajustado con hidróxido de amonio). El precipitado resultante se puede centrifugar, lavar, secar y calcinar para obtener una sustancia de tipo hidroxiapatita. Combinando nitrato de calcio con nitrato de estroncio en el porcentaje de sustitución correspondiente se pueden producir partículas de hidroxiapatita de estroncio-calcio que pueden ser inyectadas junto con fibrina en un defecto óseo.
- 35

- 40 Este ejemplo muestra datos que demuestran que las partículas de tipo hidroxiapatita de calcio sustituida con estroncio estimulan la formación de hueso nuevo mejor que la fibrina sola o las partículas de tipo hidroxiapatita de calcio pura. Estos resultados proporcionan una corroboración *in vivo* de los datos obtenidos durante el cultivo celular preliminar.

Materiales y métodos:

- 45 En los estudios descritos en el presente ejemplo se utilizaron los siguientes reactivos químicos. Nitrato tetrahidrato de calcio; 99% reactivo A.C.S. [Sigma-Aldrich; 237124-500G; FW: 236,15]; nitrato de estroncio p.A. > 99% [Fluka; 85899 500 g; lote y código de llenado: 1086321, 53706181; FW: 211,63]; fosfato de amonio bifásico p.A. [Riedel-de Haën; 30402 500 g; FW: 132,06]; hidróxido de amonio [Sigma-Aldrich, 318612-2L; lote n°: 11103PD; FW: 35,05; 5 N en H₂O]; EtOH 96%; Fibrinkleber [Baxter AG; Fibrinkleber TIM 3; 08P6004H; 5 ml; 1500434]; trombina [Baxter AG; B205553 thromb. SD TIM 5; 500 IE; US 5 ml]; cloruro de calcio dihidratado (mín. 99%) [Sigma; C7902-1KG; lote n°: 044K0160]; y cloruro de sodio [Merck, 1.06404.1000 1 kg; carga/lote: K38062004 745; FW: 58,44.
- 50

En los experimentos se emplearon las siguientes soluciones diversas: CaCl₂ 40 mM + NaCl 200 mM: 1,47g CaCl₂ + 2,92 g NaCl en 250 ml ddH₂O; trombina liofilizada reconstituida en 5 ml de CaCl₂ 40 mM + NaCl 200 mM y fibrinógeno liofilizado reconstituido en 5 ml de 3000 KIE/ml aprotinina.

Los experimentos se realizaron en 4 grupos de ensayo con 6 rodillas de conejo, en cada caso de la siguiente manera:

- Grupo 1. Fibrina + trombina (8 IU/ml concentración final)
- Grupo 2. Fibrina + trombina (8 IU/ml concentración final) + 100% Ca (0% sustitución de Sr)
- 5 Grupo 3. Fibrina + trombina (8 IU/ml concentración final) + 75% Ca (25% sustitución de Sr)
- Grupo 4. Fibrina + trombina (8 IU/ml concentración final) + 20% Ca (80% sustitución de Sr).

Preparación de los materiales de ensayo:

- 10 El fibrinógeno se reconstituyó y se dividió en partes alícuotas en jeringuillas de 1 ml [Braun; omifix -1 ml; Luer] con 0,5 ml de fibrinógeno por jeringuilla. La trombina se reconstituyó y diluyó con CaCl_2 40 mM + NaCl 200 mM a 16 IU/ml. Esta dilución también se dividió en partes alícuotas en jeringuillas de 1 ml, 0,5 ml por jeringuilla.

- 15 Los polvos de hidroxiapatita se produjeron agitando juntos volúmenes iguales de solución 2M de nitrato de calcio (o de acuerdo con el porcentaje de sustitución de estroncio también nitrato de estroncio, la solución resultante ha de ser 2M en total) y solución 1,2M de fosfato de amonio. Una adición subsiguiente de un volumen igual de hidróxido de amonio aumentó el pH del precipitado a 11 e hizo que el precipitado pastoso se volviera líquido. Después de agitar a fondo, la mezcla se centrifugó, el sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó dos veces con alcohol (etanol 96%) y una vez con ddH₂O. Entre los pasos de lavado, en cada caso el precipitado se decantó y centrifugó y el sobrenadante se desechó. Después, el precipitado se secó a 60°C bajo vacío durante un día, se molió y se calcinó durante 1 hora a 1.100°C.

- 20 Después de enfriar, las partículas de tipo hidroxiapatita se esterilizaron con calor y se dividieron en partes alícuotas en jeringuillas de 1 ml, 0,3 g por jeringuilla.

Tratamiento de los conejos

- 25 Para realizar el experimento principal se utilizaron 12 conejos. Éstos fueron sedados y se realizó una perforación (4,5 mm de diámetro) en los cóndilos femorales. Cada una de estas perforaciones se rellenó con uno de los materiales de ensayo arrastrando el componente de trombina con partículas y después con fibrinógeno, o solo trombina con fibrinógeno como control. El cono de las jeringuillas de 1 ml encajaba perfectamente en las perforaciones, lo que posibilitó una aplicación directa.

Después de inyectar el material respectivo (aleatorizado para las 24 rodillas), se suturó la piel y el conejo se mantuvo en observación durante las siguientes 8 semanas.

- 30 *Análisis posoperatorio*

Ocho semanas después, los conejos fueron sacrificados, sus rodillas se analizaron mediante μCT y se tiñeron histológicamente secciones delgadas.

Resultados

- 35 Análisis μCT : Debido a la gran opacidad de las muestras de estroncio resultaba difícil obtener resultados cuantitativos, por lo que el análisis se llevó a cabo de forma semicuantitativa evaluando y cuantificando las imágenes de μCT a simple vista. La evaluación de la formación de hueso se realizó en tres niveles (1: bajo; 2: medio; 3: alto). La evaluación de una perforación cerrada se llevó a cabo asignando un "+" a una perforación cerrada y un "-" a una perforación no cerrada. Los datos se muestran en gráficos en las Figuras 8 a 14. Todos los gráficos representan valores medios de animales tratados evaluables, mientras que las imágenes de μCT son instantáneas.
- 40

- La Figura 8 muestra una representación gráfica de perforaciones completamente cerradas (los dos lados están cerrados). Ninguno de los defectos de cóndilos de conejo evaluados rellenos con fibrina estaba cerrado por los dos lados, por ello en la Figura 8 se ve un cero por ciento de límites de perforación completamente cerrados. La sustitución de un 25% de Sr en las partículas dio como resultado el valor más alto: un 80% de límites de perforación cerrados.
- 45

La Figura 9 muestra la μCT de un cóndilo femoral de conejo en presencia de fibrina. El defecto todavía es visible, pero no se observa ningún material residual (fibrina); un lado de la perforación sigue estando abierto.

La adición de estroncio produce efectos notables. La Figura 11 muestra la μCT de un cóndilo femoral de conejo en un material de un 80% Sr. Aunque el defecto sigue siendo visible, la mayor parte del mismo está

rellena; el material (Sr 80%) se ve claramente. Se puede identificar claramente la formación de hueso nuevo y los dos lados de la perforación están cerrados.

Los resultados citados también se confirmaron mediante estudios histológicos. La Figura 12 muestra una sección delgada teñida histológicamente de un defecto de cóndilo femoral de conejo tratado con fibrina. No hay nada de sustancia de ensayo presente. Por consiguiente, no se observa ningún signo de inflamación. Dentro de la perforación sólo se encuentran unas pocas trabéculas cortas de hueso esponjoso. En la abertura del canal de trépano, la sustancia ósea recién formada es de tipo esponjoso. Dentro de la cavidad de perforación, los vasos sanguíneos están distribuidos prácticamente de modo regular, mostrando únicamente unos puntos menos vascularizados. En un lado de la cavidad de perforación hay varios vasos sanguíneos más grandes muy cerca de la sustancia ósea.

En las muestras tratadas con un 80% de estroncio en el coágulo de fibrina (Figura 13), un 40-70% del canal de perforación está relleno de la sustancia de ensayo. En todas las muestras, la sustancia de ensayo tiene una forma alargada dentro de la cavidad de perforación. En una muestra es más granular, mientras que las otras dos presentan una sustancia de ensayo más gruesa. Dos de tres muestras presentan fibrina en forma de parches grandes cerca de la sustancia de ensayo. Las inflamaciones son escasas en una muestra y varían entre 3 y 10 inflamaciones grandes en los otros especímenes. En una muestra, la sustancia de ensayo está en contacto directo con el tejido óseo recién producido, mientras que en las otras dos está más separada. Dos muestras tienen vasos sanguíneos distribuidos regularmente dentro de la cavidad de perforación, mientras que la tercera presenta una vascularización más arrimada.

20 *Discusión*

Los datos de μ CT muestran que las formulaciones que contienen partículas de tipo hidroxiapatita sustituida por un 25% de Sr provocan un cierre de una perforación mejor que las otras sustancias ensayadas e inducen una formación de hueso comparable a la de las partículas sustituidas por un 80%, aunque son menos densas.

La fibrina sola provoca una menor formación de hueso y las perforaciones sólo están cerradas por un lado. Las formulaciones que contienen partículas de tipo hidroxiapatita de calcio pura no son tan densas, pero parecen no inducir ninguna formación de hueso ni cierre de las perforaciones.

La formulación con alta concentración de estroncio es muy densa e induce la formación de hueso nuevo, pero no significativamente más que en caso de un 25% de Sr. Además, el cierre de la perforación es peor en comparación con una concentración más baja de estroncio, así que incluso concentraciones bajas de estroncio son suficientes para inducir la formación de hueso.

Los resultados histológicos sugieren que la sustitución de estroncio en partículas de tipo hidroxiapatita de calcio induce la formación de hueso nuevo. En todas las muestras se detectó vascularización, un requisito previo para la inmigración de osteoblastos y por lo tanto para la formación de hueso nuevo.

35 **Ejemplo 4: El estroncio tiene un efecto sinérgico con la PTH en células osteoblásticas**

Este ejemplo describe estudios *in vitro* en células de osteosarcoma de rata para investigar el efecto de una combinación de hormona paratiroidea (PTH) y estroncio (utilizado como SrCl_2) en la activación de factores de formación de hueso como un aumento de la producción de AMPc en osteoblastos. Los estudios aquí descritos muestran que el SrCl_2 tiene un efecto sinérgico positivo con la PTH en la generación de AMPc en células osteoblásticas. Este efecto no se ha observado en ningún caso en células tratadas con CaCl_2 . Dado que, como es sabido, el AMPc induce una formación de hueso anabólica, los datos aquí presentados respaldan la conclusión de que una terapia combinada de Sr y PTH conducirá a un aumento de la formación de hueso *in vivo*.

Materiales y métodos

Para la realización del bioensayo se utilizó la línea celular de osteosarcoma UMR-106 (NewLab Bioquality AG, Erkrath, Alemania).

En los ensayos abajo descritos se utilizaron los siguientes medios:

Medio de cultivo celular: DMEM (Sigma, D6546; incl. 4500 mg/l de glucosa, piruvato de Na, Na_2CO_3 , complementado con 0,584 g/l de L-glutamina); 10% FCS; L-Glu 2 mM.

Medio de inanición: DMEM (Sigma, D6546; incl. 4500 mg/l de glucosa, piruvato de Na, Na_2CO_3 , complementado con 0,584 g/l de L-glutamina); L-Glu 2 mM.

Medio SI: 10 ml de medio de inanición; IBMX 2 mM.

SrCl₂ 20 mM en medio de inanición: 19,6 ml de medio 0,4 ml SrCl₂ 1 M.

CaCl₂ 20 mM en medio de inanición: 19,6 ml de medio 0,4 ml CaCl₂ 1 M.

Cultivo celular

- 5 Las células UMR-106 se sembraron en medio de cultivo en una densidad de 30.000 células/cm² y se incubaron a 37°C/ 8,0% CO₂. Después de 24 horas, el medio se cambió por medio fresco, medio que contenía SrCl₂ 20 mM o medio que contenía CaCl₂ 20 mM. Las células se incubaron adicionalmente a 37°C/ 8,0% CO₂ durante 24 horas. Las células se recogieron de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 10 Las células se lavaron dos veces con HBSS y se separaron de la superficie utilizando 6 ml de tripsina/EDTA durante 3 minutos a temperatura ambiente. La digestión con tripsina se detuvo con 12 ml de medio de cultivo. Después de una centrifugación (3 minutos, 1.000 rpm, TA), las células se resuspendieron en 12 ml de medio de inanición y se recontaron con un contador de células CASY. La tasa de células muertas fue inferior al 10% en cada experimento. Las células se resuspendieron hasta una concentración final de 1,6 x 10⁶ células/ml en medio de inanición. En cada pocillo de una placa de 96 pocillos se introdujeron 50 µl de suspensión celular y éstos se incubaron durante 30 minutos a 37°C, 8,0% CO₂.

Tratamiento de células con 264 µg/ml de muestras de TGPIPTH en solución de fibrinógeno

Las muestras se diluyeron en medio de inanición recién preparado que contenía IBMX 2 mM (medio SI). Para preparar el medio SI se añadieron 30 µl de una carga de IBMX 0,67 M en DMSO a 10 ml de medio de inanición.

- 20 Todas las diluciones de muestra se prepararon con este medio para inhibir la actividad de fosfodiesterasa en células UMR-106 (Janik, P., 1980; Chasin M. y Harris, D.N., 1976). Después de 30 minutos de incubación a 37°C se añadieron 50 µl de muestras diluidas (como se indica en los resultados). Para la producción de AMPc se incubaron células durante 1 hora a 37°C, 8,0% CO₂. Cada concentración de muestra se añadió a células al menos por duplicado después de análisis de AMPc por duplicado.

25 Inmunoensayo enzimático Biotrak AMPc

Preparación de reactivo para EIA AMPc. El tampón de ensayo, el reactivo de lisis 1A/1B, el reactivo de lisis 2A/2B, el patrón ZMPc, el antisuero, el conjugado de peroxidasa AMPc y el tampón de lavado se prepararon de acuerdo con el manual del fabricante (*kit* cAMP Biotrak EIA, GE Healthcare). También se preparó una solución de interrupción de ácido sulfúrico 1 M mediante dilución de 53 ml de H₂SO₄ (conc. = 18,76 M) con 947 ml ddH₂O.

- 35 *Lisis celular y dilución de AMPc.* Para la extracción de AMPc, 100 µl de suspensión celular que contenía PTH se incubaron con 25 µl (dilución final 1:5) de disolvente reactivo de lisis 1A, que forma parte del *kit* cAMP Biotrak EIA, (GE Healthcare). Para la lisis total, las células se agitaron durante 15 minutos a 500 rpm a temperatura ambiente. Por último, el AMPc extraído se diluyó 1:20 con reactivo de lisis 1B (*kit* cAMP Biotrak EIA) (dilución 1:1 en la placa de ensayo (se añadieron 125 µl de reactivo de lisis 1B) seguida de dilución 1:10 sobre la placa ELISA (90 µl de reactivo de lisis 1B + 10 µl de suspensión celular diluida)).

Preparación del patrón de trabajo de AMPc. El patrón de AMPc liofilizado para el ensayo no acetilado (*kit* cAMP Biotrak EIA) se redisolvió en tampón de ensayo para obtener una concentración de 32 pmol/ml. Se preparó una serie de diluciones dobles de 32 pmol/ml a 0,5 pmol/ml.

- 40 *Control interno.* 100 µl de cada patrón y dilución de muestra se transfirieron al pocillo apropiado y se analizaron por duplicado. Además, para mostrar la especificidad del ELISA de AMPc se requerían dos controles internos diferentes, el control de sitio no específico (NSB) y un control cero (0), y se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare).

- 45 *Procedimiento de inmunoensayo enzimático.* A cada pocillo excepto el control NSB se añadieron 100 µl de antisuero. La reacción de anticuerpo se realizó durante 2 horas a 4 °C con agitación. Después de la incubación con 50 µl de conjugado de peroxidasa AMPc durante 1 hora a 4°C con agitación, todos los pocillos se lavaron cuatro veces con 300 µl de tampón de lavado. Finalmente se añadieron 150 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) a cada pocillo y se permitió que la reacción del sustrato procediera durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se interrumpió añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 1M y la densidad óptica se determinó inmediatamente en un lector de placas a 450 nm.
- 50

- 5 *Análisis de datos.* La densidad óptica se determinó en un lector de placas (Synergy HT) midiendo la absorbancia de las muestras a 450 nm utilizando el *software* KC4. Las correcciones de fondo, los cálculos de valores medios, las desviaciones estándar, los coeficientes de variación y la generación de curvas estándar se realizaron con Microsoft Excel 2000. Para los ajustes de 4 parámetros y los cálculos de EC50 se utilizó SigmaPlot 9.0. Para el Análisis de Líneas Paralelas y la detección de la Potencia Relativa se utilizó PLA1.2 (Stegmann Systemberatung).

Porcentaje de conjugado de peroxidasa AMPc unido. El porcentaje de conjugado de peroxidasa AMPc unido de cada patrón y cada muestra se calculó utilizando la siguiente relación:

$$10 \quad B/B0 (\%) = \frac{(OD \text{ muestra} - OD \text{ nsb}) \times 100}{(OD \text{ cero} - OD \text{ nsb})}$$

OD muestra..... OD450 de muestra específica
OD cero..... OD450 de AMPc conjugado de peroxidasa solo
OD nsb..... OD450 sin anticuerpo AMPc

- 15 *Curva estándar.* La curva estándar de AMPc se generó trazando un gráfico del porcentaje B/B0 (eje y) en función del log c(AMPc) (eje X).

Concentración de AMPc de las muestras. Teniendo en cuenta el factor de dilución (20x) las cantidades de AMPc producidas se calcularon utilizando los parámetros (solapamiento e interceptación) de la curva estándar.

Linealidad. Se evaluó el coeficiente de correlación de la curva estándar del ELISA de AMPc ($R^2 \geq 0,95$).

- 20 *Preparación de muestras para análisis de bioensayo.* Para los análisis, las muestras se diluyeron en medio de inanición que contenía inhibidor de fosfodiesterasa IBMX 2 mM (medio SI) hasta una concentración final de 2.400 nM de TGpIPTH (13,2 µg/ml de TGpIPTH). Para cada muestra se prepararon 150 µl de las siguientes o diluciones en serie y se añadieron 50 µl directamente a las células (volumen total en las células: 100 µl). Después se calcularon los valores medios de OD450, las desviaciones patrón, las concentraciones de AMPc y los coeficientes de variación de todas las muestras y todas las diluciones.

c:(TGpIPTH) nM	Preparación	c(TGpIPTH) pg/ml
2.400 nM (1.200 nM en células)	véase más arriba	13,2
1.200 nM (600 nM en células)	1:1 en medio de dilución	6,6
600 nM (300 nM en células)	1:1 en medio de dilución	3,3
300 nM (150 nM en células)	1:1 en medio de dilución	1,65
150 nM (75 nM en células)	1:1 en medio de dilución	0,83
75 nM (38 nM en células)	1:1 en medio de dilución	0,42
38 nM (19 nM en células)	1:1 en medio de dilución	0,21
19 nM (10 nM en células)	1:1 en medio de dilución	0,1

Tabla de Dilución en Serie. Para generar una curva dosis-respuesta se realizaron siete pasos de dilución en serie individualizados de cada muestra y todas las diluciones se analizaron por triplicado.

Resultados

- 30 La influencia del SrCl₂ y el CaCl₂ en la bioactividad de la PTH se controló independientemente en cinco experimentos diferentes. Estos estudios han demostrado que una preincubación de 24 horas de células UMR-106 con SrCl₂ 20 mM antes del tratamiento con TGpIPTH produce un aumento de la bioactividad al doble, mientras que el CaCl₂ no muestra ningún cambio en la bioactividad de PTH (Figura 14). Estos resultados indican que el estroncio y la PTH tienen un efecto sinérgico en la producción de AMPc y respaldan la conclusión de que una combinación de PTH y estroncio conduciría a una formación de hueso anabólica *in vivo*.

Reivindicaciones

1. Composición que comprende fibrinógeno, trombina y un compuesto con contenido en estroncio para su uso en la cicatrización o el crecimiento óseos, estando presente el estroncio en un 25% de sal cálcica sustituida con estroncio, opcionalmente siendo reabsorbida dicha composición y reemplazada por tejido durante el proceso de cicatrización.
2. Composición para el uso según la reivindicación 1, caracterizada porque está en forma de gel, masilla, pasta o líquido.
3. Composición para el uso según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque adicionalmente comprende un plastificante.
4. Composición para el uso según la reivindicación 3, caracterizada porque el plastificante es un compuesto con contenido en yodo.
5. Composición para el uso según la reivindicación 4, caracterizada porque el compuesto con contenido en yodo se selecciona de entre el grupo consistente en diatrizoato, iodecol, iodixanol, iofratol, iogulamida, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopromida, iotrol, ioversol, ioxagulato y metrizamida, y mezclas de los mismos y alcoholes polivalentes.
6. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque contiene una o más proteínas extracelulares seleccionadas de entre el grupo consistente en proteínas de matriz extracelulares tales como fibronectina, proteínas asociadas a células, proteínas derivadas de plasma, como factor de coagulación sanguínea XIII, proteasas e inhibidores de proteasa.
7. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque adicionalmente comprende un agente inductor de la coagulación tal como protamina, veneno de serpiente, transglutaminasas, FXIIa o un sistema tampón alcalino fisiológicamente aceptable.
8. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el compuesto con contenido en estroncio está en una forma granular microparticulada soluble o en una forma sólida.
9. Composiciones para el uso según la reivindicación 8, caracterizadas porque el compuesto con contenido en estroncio se prepara añadiendo estroncio a un compuesto con contenido en calcio para producir un material que comprende sales que contienen calcio y estroncio.
10. Composición para el uso según la reivindicación 9, caracterizada porque dicho compuesto con contenido en calcio es un fosfato de calcio.
11. Composición para el uso según la reivindicación 10, caracterizada porque el fosfato de calcio se selecciona de entre el grupo consistente en fosfato tricálcico, fosfato alfa-tricálcico, fosfato beta-tricálcico, polimorfos de fosfato de calcio, hidroxiapatita, carbonato de calcio, sulfato de calcio y combinaciones de los mismos.
12. Composición para el uso según la reivindicación 9, caracterizada porque los compuestos con contenido en estroncio o con contenido en calcio tienen un tamaño de partícula que oscila entre 100 nanómetros y 50 milímetros, preferentemente donde los compuestos con contenido en estroncio o con contenido en calcio tienen un tamaño de partícula de 0,5 a 5 milímetros.
13. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el compuesto con contenido en estroncio se selecciona de entre el grupo consistente en cloruro de estroncio, ranelato de estroncio, acetato de estroncio, glutamato de estroncio, aspartato de estroncio, malonato de estroncio, maleato de estroncio, ascorbato de estroncio, treonato de estroncio, lactato de estroncio, fosfato de estroncio, apatitas de estroncio, piruvato de estroncio, alfa-cetoglutarato de estroncio y succinato de estroncio.
14. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque adicionalmente comprende un coligando de estroncio seleccionado de entre el grupo consistente en grupos calcimiméticos, osteocalcina, aminoácidos como L-arginina y arginomiméticos y análogos de arginina.

15. Composición para el uso según la reivindicación 3, caracterizada porque el plastificante es un polietilenglicol, un alcohol polivalente, glicerol, o un azúcar seleccionado de entre el grupo consistente en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos y combinaciones de los mismos.
- 5 16. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque además comprende una proteína seleccionada de entre el grupo consistente en proteínas morfogénicas óseas, hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, bisfosfonatos, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento análogos a la insulina y factores de crecimiento TGF.
- 10 17. Composición para el uso según la reivindicación 16, caracterizada porque la proteína es hormona paratiroidea (PTH).
18. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el compuesto que contiene estroncio está presente en la composición en una concentración de 2,5 mM a 25 mM.
- 15 19. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el compuesto con contenido en estroncio está presente en la composición en una proporción entre el 30 y el 50% (p/v) del fibrinógeno y la trombina combinados.
- 20 20. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la cantidad de estroncio está presente en forma de un quelato de estroncio.
21. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso en inyección en hueso esponjoso para el tratamiento de un hueso enfermo, lesionado o deficiente en un ser vivo.
22. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso en la reparación de un defecto óseo rellenando el defecto en una cantidad que produce la reparación de dicho defecto, combinándose dicho uso de dicha composición con una fijación mecánica del hueso o de partes del mismo para lograr una reparación ósea.
- 25 23. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso en promover el crecimiento de hueso nuevo en el sitio de un defecto óseo.

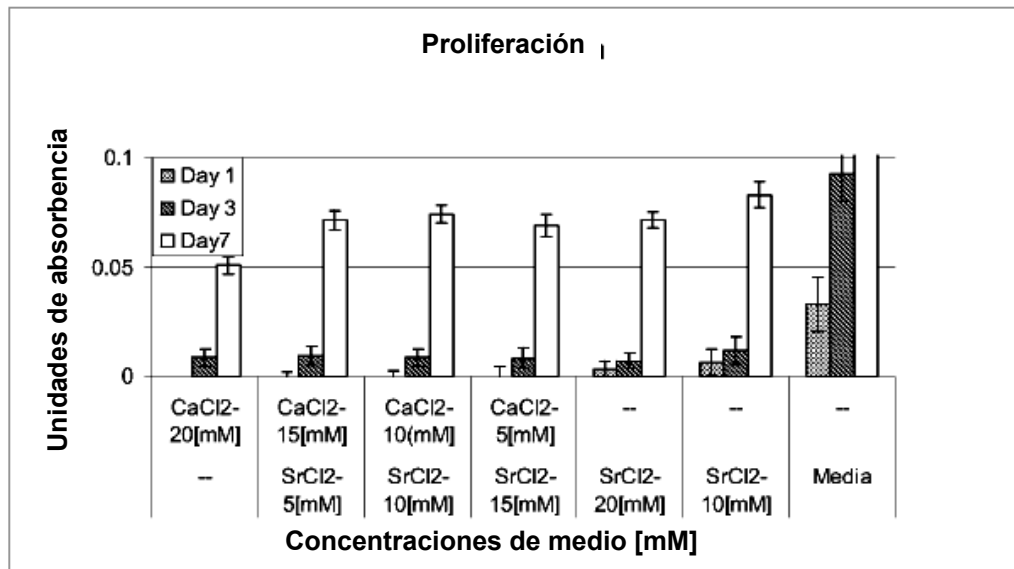


Figura 1

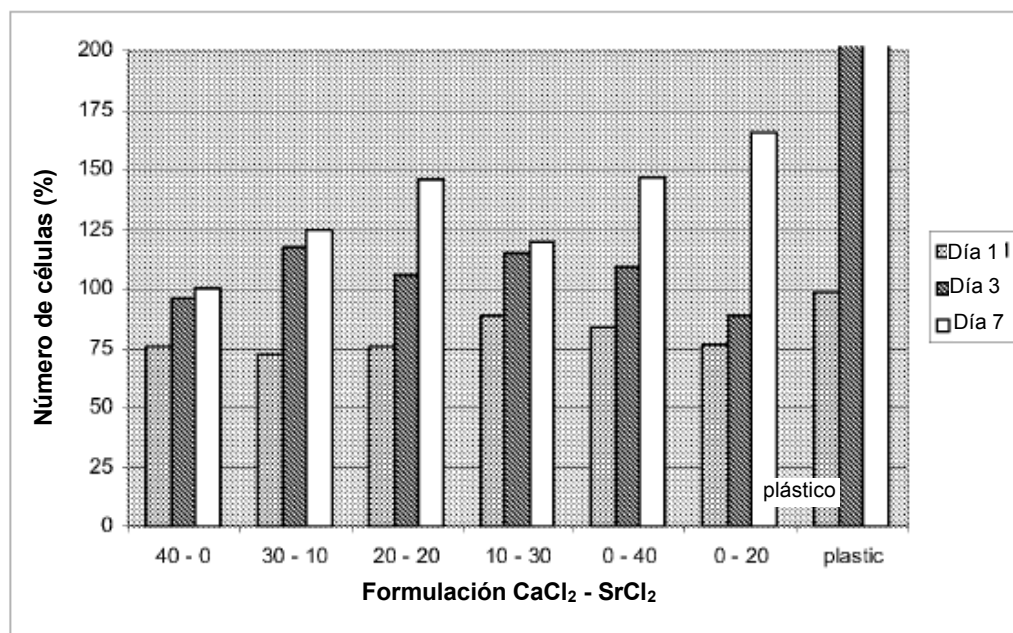


Figura 2

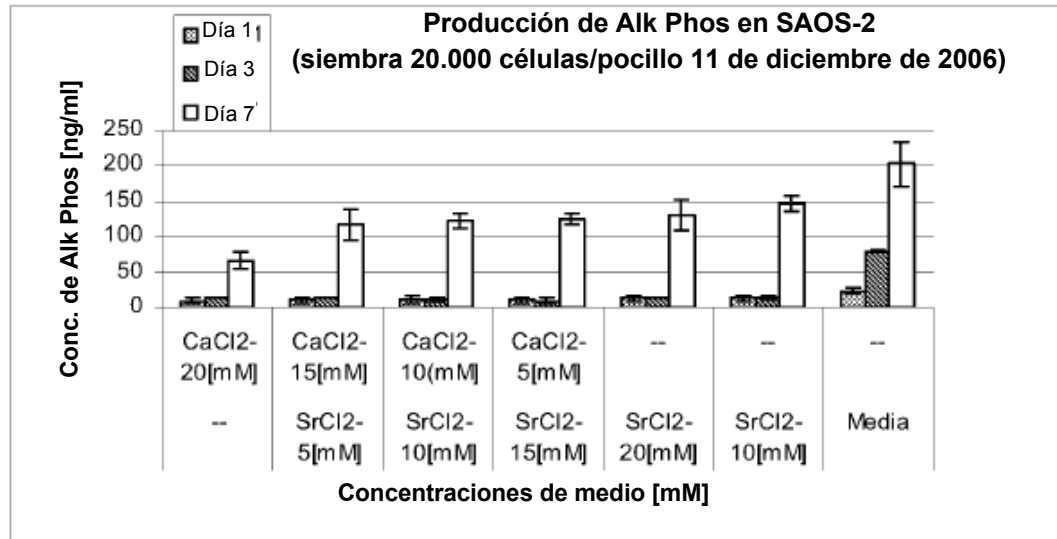


Figura 3

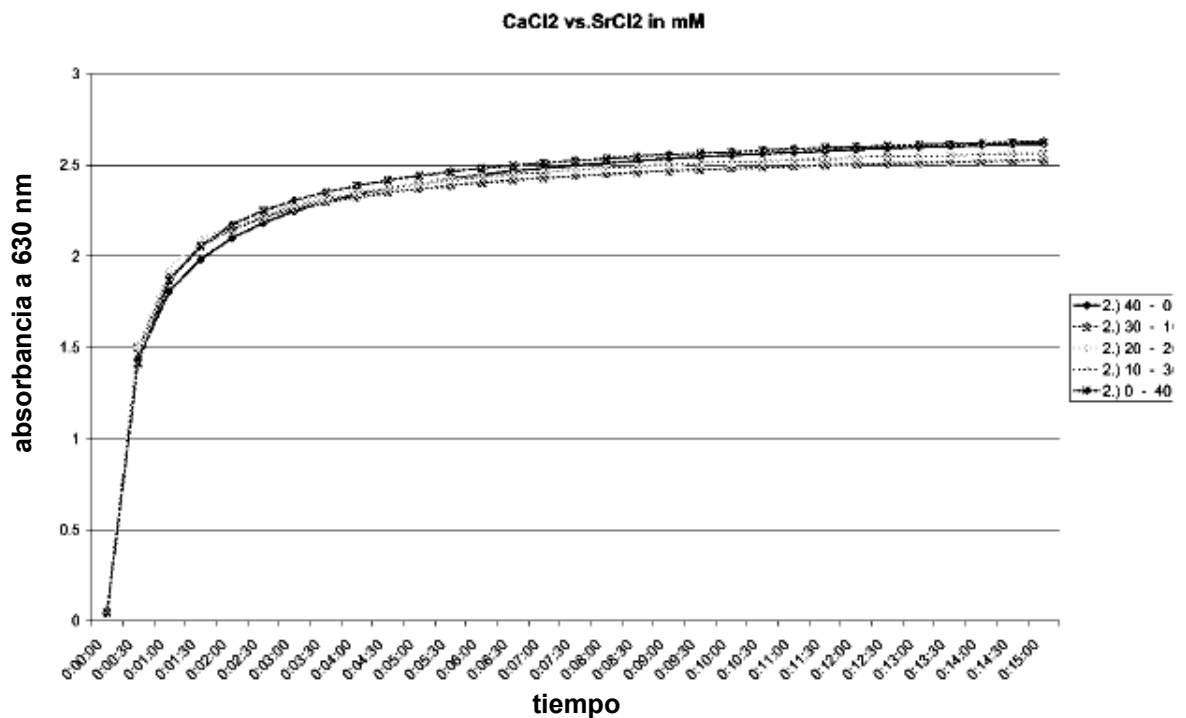


Figura 4

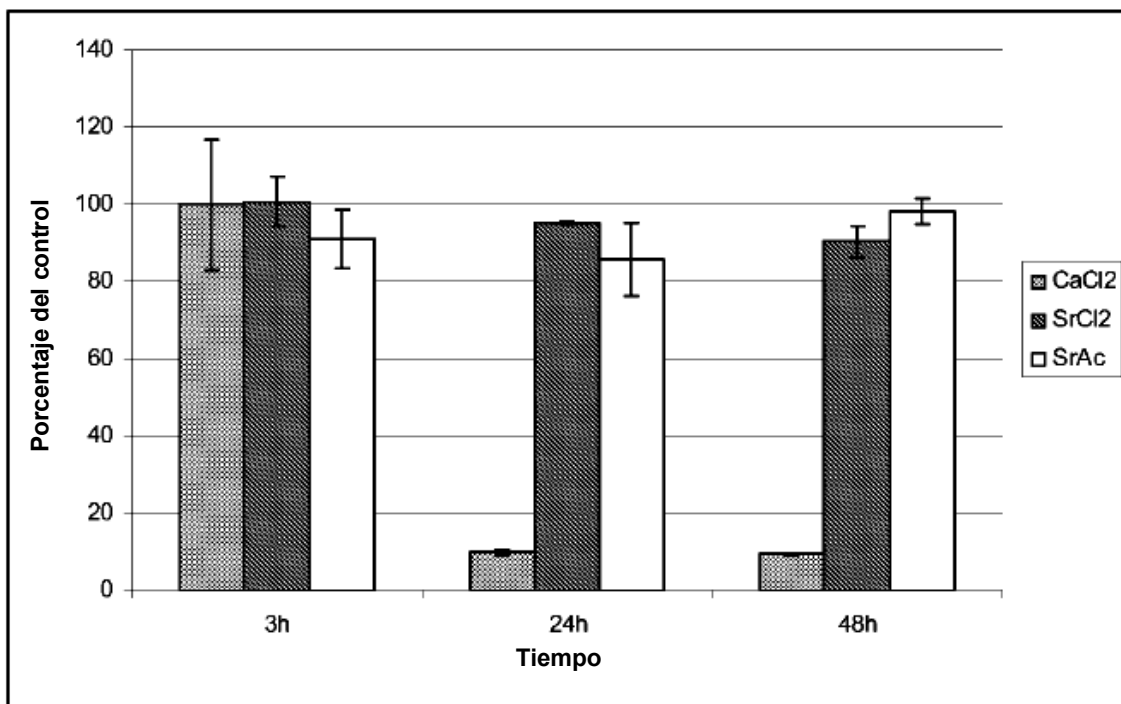


Figura 5

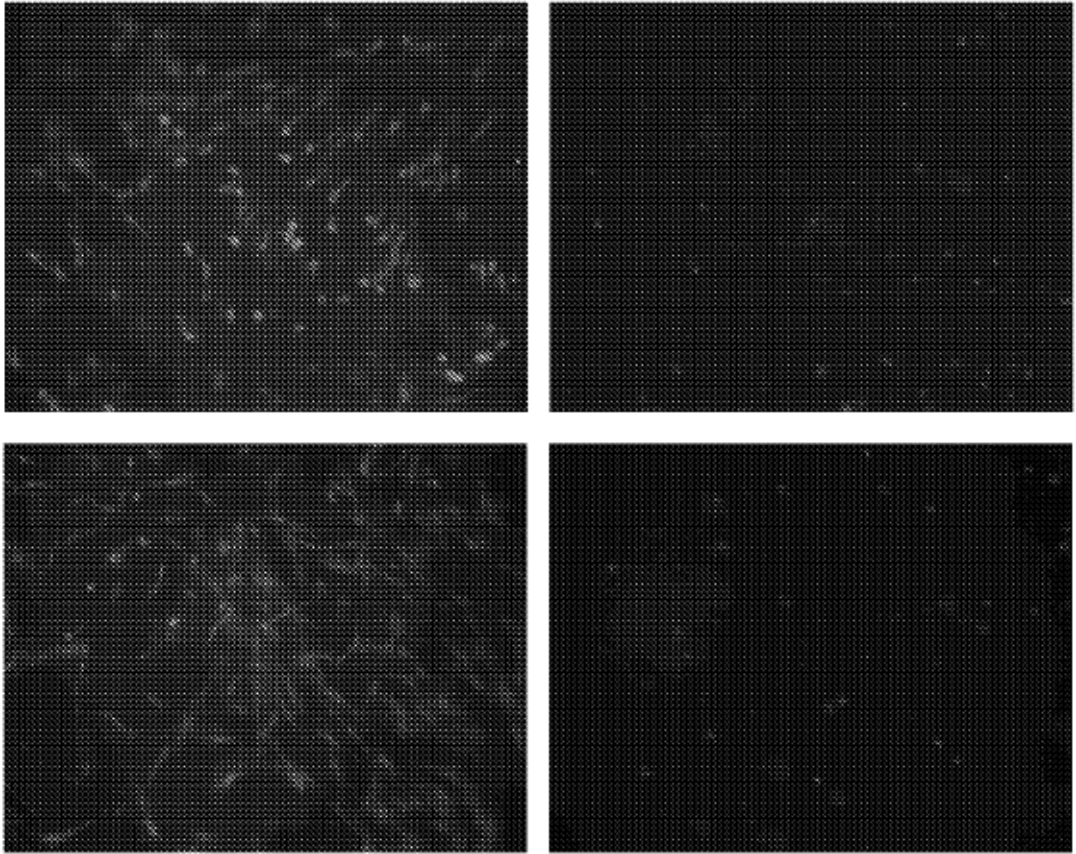


Figura 6

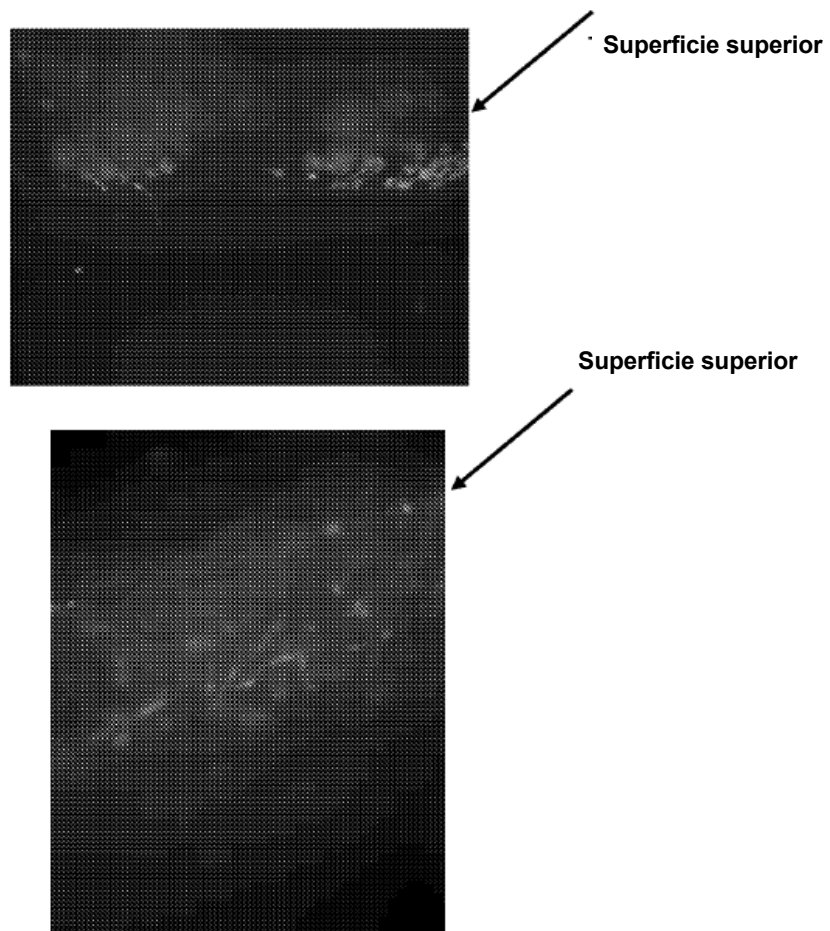


Figura 7

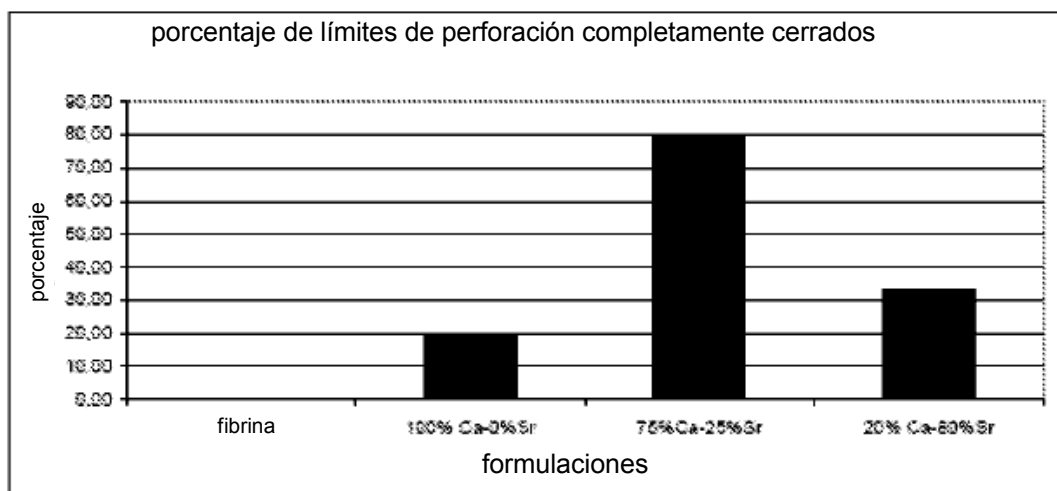


Figura 8

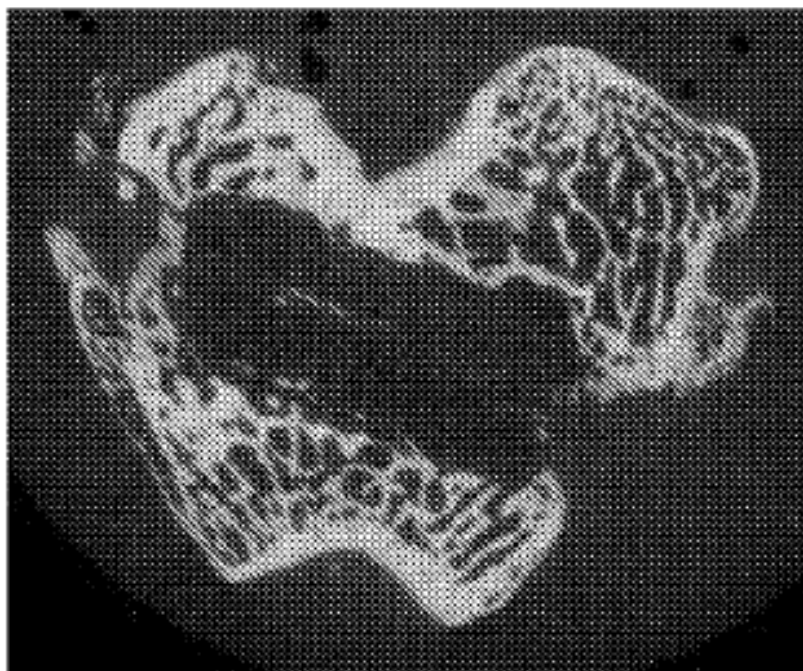


Figura 9

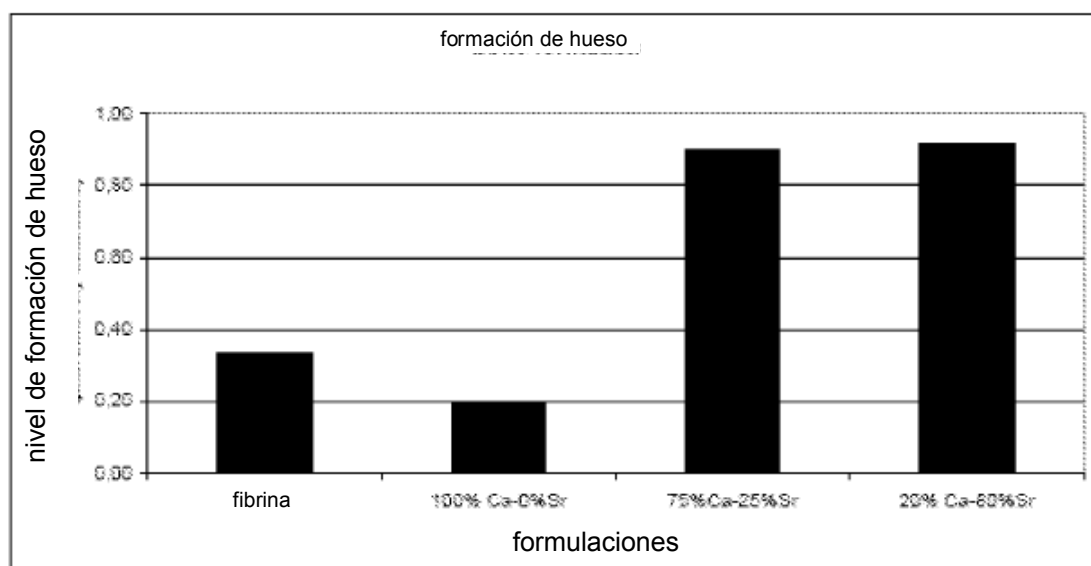


Figura 10

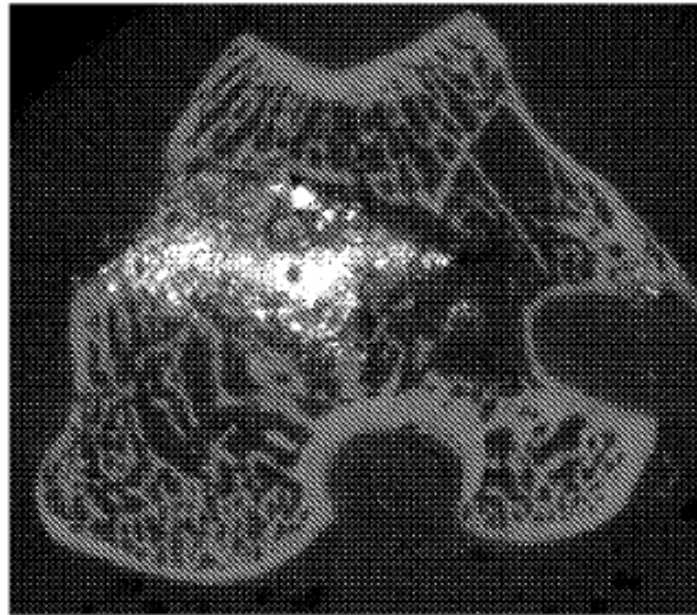


Figura 11

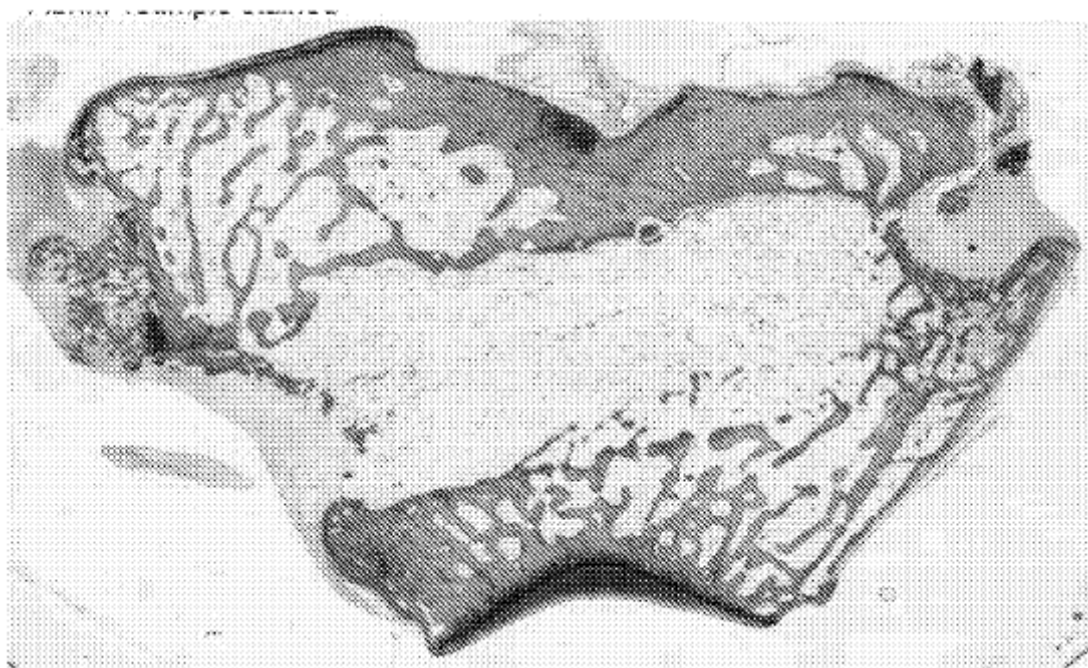


Figura 12

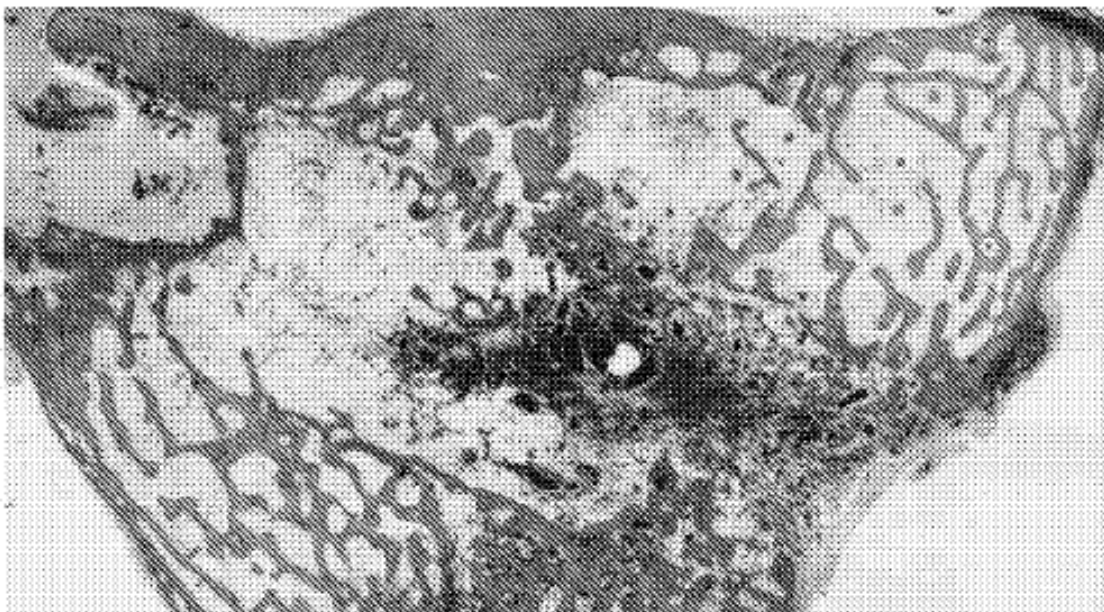


Figura 13

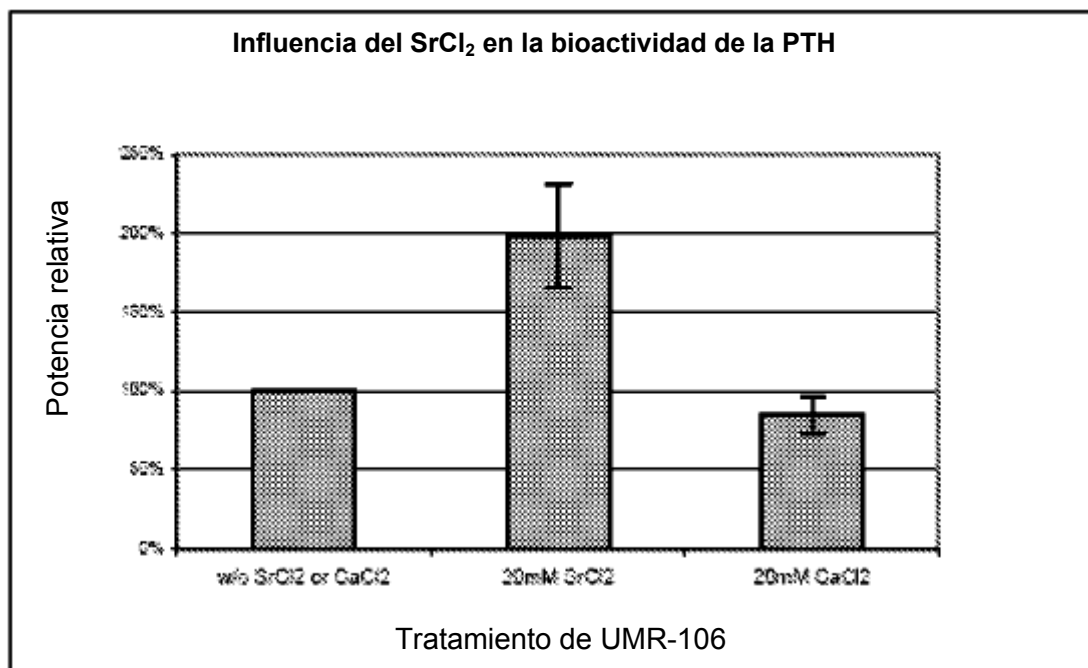


Figura 14