

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 122**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/12** (2006.01)

**A61L 27/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2014 PCT/EP2014/053330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128217**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014 E 14706531 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2958603**

54 Título: **Endurecimiento mejorado de sustituto óseo endurecible**

30 Prioridad:

**20.02.2013 EP 13155895**  
**20.02.2013 US 201361766820 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.06.2018**

73 Titular/es:

**BONE SUPPORT AB (100.0%)**  
**Scheelevägen 19A**  
**223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**EHRENBORG, KRISTINA CAROLINE VICTORIA;**  
**SANDELL, VERONICA REBECCA y**  
**LIDÉN, EVA CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 671 122 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

Endurecimiento mejorado de sustituto óseo endurecible

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones de sustitutos óseos cerámicos endurecibles que tienen un endurecimiento mejorado, polvos para tales composiciones y métodos para su fabricación y uso en el tratamiento médico. De manera más específica, la invención se refiere a un polvo de sustituto óseo endurecible y una pasta de sustituto óseo endurecible con propiedades de endurecimiento mejoradas, que comprende sulfato cálcico e hidroxapatito tratado térmicamente (HA pasivado), cuyo sustituto óseo es adecuado para el tratamiento de trastornos del tejido de sostén, tales como osteopenia, fractura ósea, traumatismo óseo y osteomielitis.

**10 Antecedentes de la invención**

El hueso es el segundo tejido más habitual para trasplante, después de la sangre. El método más fiable para reparar los defectos óseos es usar hueso autógeno, es decir, hueso obtenido de otro sitio del cuerpo. Sin embargo, pueden surgir problemas en el segundo sitio quirúrgico del que se obtiene el injerto. Para evitar este traumatismo extra, se pueden usar aloinjertos, es decir, injertos de hueso entre individuos de la misma especie. Los aloinjertos tienen una capacidad osteogénica inferior que los autoinjertos, y la velocidad de formación de hueso nuevo podría ser inferior. También tienen una velocidad de reabsorción mayor, una respuesta inmunógena mayor y menos revascularización del receptor. Los aloinjertos también se deben controlar con respecto a los virus, ya que pueden transmitir, por ejemplo, el VIH y la hepatitis. El uso de aloinjertos es el método más habitual en la actualidad para el trasplante de hueso y la reparación de los defectos óseos. Para resolver los problemas de suministro, resistencia impredecible y riesgo de infección, los sustitutos óseos sintéticos se han convertido en una alternativa realista. Así, la demanda y uso de sustitutos óseos sintéticos está creciendo rápidamente.

Los sustitutos óseos sintéticos cerámicos se pueden dividir en dos tipos principales. Un tipo se basa en fosfato de calcio como componente de endurecimiento, y estos se denominan cementos de fosfato de calcio. Otro tipo se basa en sulfato de calcio como componente de endurecimiento. La ventaja más importante del sulfato de calcio es su excelente biocompatibilidad. Las desventajas de los sustitutos óseos de sulfato de calcio puro son la reabsorción rápida y resistencia baja, lo cual los hace menos útiles en los defectos mayores o no contenidos, y cuando la cicatrización de la fractura supera las 4-6 semanas.

Bone Support AB ha desarrollado sustitutos óseos basados en sulfato de calcio endurecibles e inyectables, en los que la fase de polvo comprende aproximadamente un 40 %p de hidroxapatito (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) sinterizado y aproximadamente un 60 %p de sulfato de calcio hemihidrato, CSH, ( $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ ). De los dos componentes, solamente CSH se endurecerá durante el proceso de endurecimiento. El polvo de HA permanecerá sin disolver. La fase líquida de la pasta inyectable consiste en una disolución acuosa que para algunos de los productos contiene moléculas de iohexol para aumentar la radiopacidad del material (documento WO2003/053488). Si solamente hubiera sulfato de calcio en el sustituto óseo, se daría una reabsorción completa del material en aproximadamente 4-6 semanas. Sin embargo, debido a que también hay HA en la muestra, esto frenará la reabsorción de sulfato de calcio. Además, el HA de la muestra permanecerá en el sitio de implantación durante un tiempo más largo debido a su elevada cristalinidad y su baja solubilidad.

El documento US 5766247 describe un material para la implantación en el cuerpo, que comprende partículas ultrafinas de hidroxapatito de menos de 2 micras de diámetro.

40 El documento US 5766247 describe un material para la implantación en el cuerpo, que comprende partículas ultrafinas de hidroxapatito de menos de 2 micras de diámetro.

A partir del documento US 7393405 se conoce un cemento hidráulico, basado en fosfato de calcio para uso quirúrgico, sulfato de calcio dihidrato que contiene una cantidad predeterminada de sulfato de calcio hemihidrato, y agua.

45 M.V. Cabañas, L.M. Rodríguez-Lorenzo, y M. Vallet-Regi en Chem. Matter. 2002, 14, 3550-3555, describen la preparación de una mezcla de  $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  e hidroxapatito, y su comportamiento *in vitro* como cemento para el aumento óseo.

El documento US 2004/0048947 describe composiciones inyectables útiles como material sustituto del mineral óseo, que comprenden un líquido acuoso y un polvo seco que comprende sulfato de calcio hemihidrato, fosfatos de calcio sinterizados, y al menos un acelerador.

55 El tiempo de endurecimiento del sustituto óseo endurecido desde la pasta es un parámetro importante para determinar su aplicabilidad como sustituto óseo. A menudo se usan agujas Gillmore (norma ASTM C266) para medir el tiempo de endurecimiento inicial (IST) y el tiempo de endurecimiento final (FST) de los cementos. En una situación clínica, los IST y FST se pueden interpretar de forma que el cemento se debería implantar antes de que se alcance el IST, y que la herida esté lista para cerrarla después del FST. Los tiempos IST de alrededor de 5-25 min permiten

en general un tiempo suficiente para que se inyecte o moldee el cemento, y los tiempos FST de alrededor de 10-40 minutos normalmente son aceptables para el uso clínico. Se prefiere que tengan tiempos IST de alrededor de 5-15 minutos, tal como menos de 10 minutos. Los diferentes productos tienen diferentes especificaciones, ya que se usarán para diferentes aplicaciones. En la técnica se conocen otras maneras de determinar la aplicabilidad de un sustituto óseo endurecible.

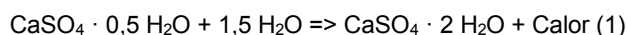
Para una diversidad de aplicaciones, es deseable poder mezclar diferentes aditivos con sustitutos óseos, en los que el sulfato de calcio es un componente de endurecimiento. Sería deseable que los sustitutos óseos que comprenden un aditivo tal como, por ejemplo, un antibiótico, fueran capaces de tratar o prevenir diferentes trastornos, p.ej. osteomielitis (infecciones óseas). Sin embargo, se ha descubierto que la adición de ciertos agentes bioactivos, tales como antibióticos, retardan el endurecimiento del sustituto óseo, de tal manera que el tiempo de endurecimiento supera los valores clínicamente aceptables. También se ha descubierto que no solamente los aditivos, sino también los componentes básicos del sustituto óseo, tales como HA, pueden tener un efecto negativo sobre las propiedades de endurecimiento. Sorprendentemente se ha descubierto que la velocidad de hidratación de CSH necesaria para el endurecimiento del sulfato de calcio en un sustituto óseo basado en sulfato de calcio que contiene HA es sumamente dependiente de las propiedades del HA.

### Sumario de la invención

La invención se expone en el grupo adjunto de reivindicaciones.

La presente invención se hizo en vista de los problemas observados con respecto a la técnica anterior descrita anteriormente, y el objetivo de la presente invención ha sido proporcionar una solución al problema, cuya solución es la provisión de un HA que, solo o junto con diferentes aditivos tales como antibióticos, no proporciona tiempos de endurecimiento pobres y/o clínicamente inaceptables a los sustitutos óseos endurecibles basados en sulfato de calcio (CSH) e hidroxiapatito (HA).

Cuando CSH se mezcla con agua, se hidratará hasta sulfato de calcio dihidrato (CSD) según el siguiente esquema de reacción (1):



La reacción de hidratación de CSH se puede resumir en tres fases (N. B. Singh y B. Middendorf, *Calcium sulfate hemihydrate hydration leading to gypsum crystallization*, Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 53 (2007) 57-77):

1) El periodo de inducción comienza inmediatamente después de mezclar el polvo de CSH con agua. El CSH se disuelve y la disolución se supersatura con respecto a los iones calcio y sulfato. Esto conduce a la precipitación del sulfato de calcio dihidrato (CSD) menos soluble. Para que la reacción de hidratación pueda continuar, los núcleos de CSD formados inicialmente necesitan tener un radio que sea mayor que un "radio crítico" (a determinar para cada sistema específico). El periodo de inducción es crucial para la reacción de hidratación, y cualquier alteración de la solubilidad de CSH o crecimiento de cristales de CSD en esta fase retrasará la reacción de hidratación adicional en un grado mayor que si las mismas alteraciones tuvieran lugar en una fase más tardía del proceso.

2) El periodo de aceleración o crecimiento comienza cuando un número suficiente de cristales de CSD han alcanzado el tamaño crítico para actuar como embriones de nucleación. El núcleo de CSD formado crecerá después y formará cristales grandes. Los cristales serán finalmente lo suficientemente grandes para entrelazarse entre sí, y la fricción entre los cristales contribuye a la resistencia del material solidificado formado.

3) La tercera fase es relativamente lenta, y consiste en la finalización de la hidratación del CSH como se ilustra en la Figura 1 en forma de una vista esquemática que muestra la fracción de sulfato de calcio hidratado en función del tiempo.

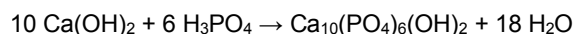
Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que las propiedades de endurecimiento impredecibles de los sustitutos óseos endurecibles que comprenden CSH y HA (Ejemplo 1), que muy a menudo conducen a tiempos de endurecimiento clínicamente inaceptables, se pueden superar haciendo que el HA sea prácticamente inerte en la reacción de hidratación de CSH exponiendo polvo de HA sinterizado y micronizado ("polvo de HA bruto"), usado normalmente en los sustitutos óseos endurecibles, a una etapa de tratamiento térmico, por ejemplo, de 500 °C durante dos horas, en la que la temperatura y el tiempo están inversamente relacionados, para obtener "polvo de HA pasivado" (pHA). El efecto negativo del HA bruto sobre el endurecimiento del sulfato de calcio en los sustitutos óseos endurecibles se puede reducir significativamente cuando el HA bruto sinterizado y micronizado ("polvo de HA bruto"), p.ej. hidroxiapatito disponible comercialmente, se trata térmicamente antes del uso. La disminución del retardo del tiempo de endurecimiento se observa cuando el polvo de HA (bruto o pasivado) se mezcla con CSH solo, pero en particular cuando se mezcla con CSH en combinación con componentes adicionales en forma de aditivos, tales como antibióticos. Este tratamiento térmico para producir HA bruto sinterizado y micronizado prácticamente inerte se denomina "pasivación" a lo largo de este documento, y el HA sinterizado y micronizado que se ha sometido a tratamiento térmico se describirá como "HA pasivado" (pHA).

Otra ventaja de pasivar HA es que el endurecimiento de un sustituto óseo endurecible se hará más fiable y se mantendrá bajo control sin cambiar la composición del sustituto óseo añadiendo productos químicos adicionales, tales como acelerantes. Con la presente invención, no es necesario aplicar procedimientos especiales cuando se añaden aditivos, tales como, por ejemplo, antibióticos, al sustituto óseo endurecible. Esto se puede observar como una mejora respecto de los intentos previos hechos por Bone Support AB de prevenir los tiempos de endurecimiento prolongados indeseables, permitiendo que la reacción de hidratación de CSH se inicie antes de añadir cualquier otro aditivo, tal como antibióticos, al sustituto óseo en su forma de pasta (documento WO 2011/098438).

También se demuestra que el HA pasivado es más resistente en el almacenamiento a lo largo del tiempo y a los cambios de temperatura y humedad relativa en el entorno de los productos de sustitutos óseos endurecibles almacenados (véase el Ejemplo 12). Además, el tiempo de endurecimiento para los sustitutos óseos endurecibles que contienen lotes diferentes de HA pasivado, pero con la misma proporción CSH/HA, se ha hecho mucho más uniforme que cuando se usa HA bruto no pasivado, y así es mucho más predecible. La variabilidad minimizada de los tiempos de endurecimiento también es sorprendentemente independiente del grado de retardo inducido por los mismos lotes de HA bruto antes de la pasivación.

#### 15 Hidroxiapatito

Se puede producir HA bruto de varias maneras. La manera más habitual de sintetizar HA es mediante métodos de precipitación húmeda con el uso de ácido ortofosfórico e hidróxido de calcio como materiales brutos, seguido de secado y calentamiento.



Se ha observado que la morfología y el tamaño de las partículas precipitadas cambian en cada etapa del proceso. Después de secar, las nanopartículas tienden a formar aglomerados pequeños.

También se puede producir HA con una reacción en estado sólido, en la que  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  se mezclan secos y después se calientan a una temperatura elevada. Para mezclar  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ , se pueden mezclar varias combinaciones de sales. Mediante el uso de diferentes combinaciones de sales, se pueden llevar a cabo muchas reacciones diferentes de precipitación/estado sólido.

Independientemente de cómo se produce HA, se mezcla  $\text{Ca}^{2+}$  con  $\text{PO}_4^{3-}$  en una proporción de 1,67. Si se va a precipitar HA, el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{PO}_4^{3-}$  se añaden a una disolución en agua, y se controla el pH y la temperatura mientras se precipita el HA.

Si se usa una reacción de precipitación, se retira el líquido y el precipitado se puede filtrar antes de secarlo y sinterizarlo finalmente a temperatura elevada, tal como por encima de 900 °C, preferiblemente entre 900 y 1350 °C. Después es necesario triturar y pulverizar/moler el hidroxiapatito sinterizado, y también se puede tamizar para conseguir la distribución adecuada de tamaños de partículas del polvo de HA bruto. La Figura 4 ilustra las diferentes etapas de una manera de producir HA bruto.

#### Dibujos

La Figura 1 muestra la fracción de CSH hidratado en función del tiempo. Tomado de N. B. Singh y B. Middendorf, *Calcium sulfate hemihydrate hydration leading to gypsum crystallization*, Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 53 (2007) 57-77.

La Figura 2 muestra el cambio de la capacidad de tamponamiento tras la pasivación del HA. Las líneas de puntos (y los símbolos claros) representan los resultados del pH/tamponamiento del lote de HA antes de la pasivación (HA bruto). La línea continua (y símbolos oscuros) representan los resultados del mismo lote de HA tras la pasivación.

La Figura 3 muestra la capacidad de tamponamiento en presencia de vancomicina. HA A es antes de la pasivación (HA bruto) y HA B es después de la pasivación. La flecha hacia arriba indica cuándo se añadió HA, y la flecha hacia abajo indica cuándo se inició la adición de HCl.

La Figura 4 muestra una figura esquemática del procedimiento para la fabricación de hidroxiapatito mediante un método de precipitación húmeda.

#### Descripción detallada de la invención

Al describir las realizaciones de la presente invención, por claridad se usará terminología específica. Sin embargo, no se pretende limitar la invención a los términos específicos así seleccionados, y se entiende que cada término específico incluye todos los equivalentes técnicos que funcionan de una manera similar para conseguir un propósito similar.

Los inventores han descubierto que el componente no endurecedor, hidroxiapatito (HA), que no experimenta recristalización de la misma manera que el sulfato de calcio hemihidrato (CSH), y que por lo tanto se podría esperar razonablemente que fuese inerte en el proceso de endurecimiento del sulfato de calcio, afecta aparentemente al

tiempo de endurecimiento hasta cierto grado como se describe en la presente memoria y en los ejemplos siguientes.

5 Cuando se producen sustitutos óseos endurecibles basados en polvos de CSH y HA como se describe en la técnica anterior, composiciones idénticas, con la única diferencia de que el componente de HA bruto (sinterizado) provenga de diferentes lotes, pueden proporcionar tiempos de endurecimiento completamente diferentes, incluso cuando el HA  
bruto tiene similares distribuciones de tamaños de partículas y superficies específicas. Un ejemplo de esta  
observación se muestra en el Ejemplo 1. Debido a la variabilidad de los resultados del tiempo de endurecimiento  
cuando se mezcla CSH con HA, antes de la presente invención, se tenía que llevar a cabo un pre-ensayo de todos  
los lotes potenciales de HA de un proveedor antes de poder seleccionar y adquirir lotes específicos con propiedades  
adecuadas de endurecimiento en cantidades mayores.

10 En la práctica, esto significaba que se tenían que ensayar pequeñas cantidades de un gran número de lotes de HA  
disponibles del mismo o diferentes productores con respecto a sus propiedades de endurecimiento en una  
composición de sustituto óseo de CSH/HA, como se describe en el Ejemplo 1, y los únicos lotes que cumplían los  
requisitos de comportamiento (tiempos aceptables de endurecimiento) se adquirirían en mayor cantidad para el uso  
en los productos de sustitutos óseos fiables. Esto también significaba que solamente alrededor de 3-4 de 10 lotes  
15 ensayados de HA bruto se podían usar con un tiempo de endurecimiento aceptable, pero todavía fluctuante, en las  
composiciones de sustitutos óseos sin aditivos.

La diferencia es aún más pronunciada cuando se añaden otras sustancias a la composición de CSH/HA, tal como  
cuando se añaden antibióticos. Mediante la introducción de aditivos, dos composiciones con aproximadamente los  
mismos tiempos de endurecimiento sin el aditivo pueden endurecerse, después de introducir el aditivo, a velocidades  
muy diferentes, y un sistema mantiene tiempos de endurecimiento clínicamente relevantes y el otro muestra un  
tiempo de endurecimiento que es demasiado lento para ser clínicamente aceptable, o incluso en el que se excluye  
una hidratación completa de CSH. Un ejemplo de la dependencia de un lote de HA sobre la variación en los tiempos  
de endurecimiento en los sistemas que comprenden el antibiótico, hidrócloruro de vancomicina, se muestra en el  
Ejemplo 2. Cuando se vaya a mezclar tal aditivo adicional, p.ej. antibióticos, en el sustituto óseo, se podría usar  
20 solamente un número pequeño de los lotes de HA ensayados, es decir, solamente 1 o menos de un total de 10 lotes  
ensayados, con un resultado de endurecimiento satisfactorio. También se ha descubierto que los aditivos, tales  
como antibióticos, que no tienen un efecto retardante sobre la hidratación de CSH en un sistema que contiene  
solamente sulfato de calcio y un líquido acuoso proporcionan tiempos de endurecimiento largos clínicamente  
inaceptables en el mismo sistema cuando hay presente HA. Esto se ilustra en el Ejemplo 3. El papel crítico de HA  
30 para los tiempos de endurecimiento del sustituto óseo que contiene sulfato de calcio es sorprendente, ya que el  
sulfato de calcio, y no el HA, es el componente de endurecimiento. Previamente, se ha considerado que el HA es  
"inerte", y por lo tanto que no está implicado en ninguna etapa de la reacción de hidratación de CSH descrita  
anteriormente.

Al comparar un sustituto óseo endurecible basado en CSH como componente de endurecimiento, y HA pasivado y  
HA bruto que no se ha pasivado, respectivamente, como componente no endurecedor, se observa (Ejemplo 4) que  
hay una reducción significativa de los tiempos de endurecimiento de tales sustitutos óseos endurecibles cuando se  
usa HA pasivado en vez de HA bruto.

La reducción de los tiempos de endurecimiento por pasivar el HA antes del uso es aún más pronunciada cuando hay  
presentes aditivos, tales como antibióticos, en la composición de CSH/HA. Esto se muestra en los Ejemplos 9-11.

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a sustitutos óseos endurecibles que comprenden como los dos  
componentes principales HA cristalino pasivado y CSH, en los que el sustituto óseo muestra un tiempo de  
endurecimiento más rápido tras la pasivación del HA cristalino.

#### Pasivación de hidroxiapatito

Es deseable que el HA presente en los polvos de la presente invención tenga una velocidad de reabsorción lenta  
dentro del cuerpo. Para que el HA tenga una reabsorción lenta, la solubilidad del HA debería ser lo más baja posible.  
La solubilidad se determina principalmente mediante la estequiometría y el tamaño de los cristales. Cuando se  
prepara HA para el uso en un sustituto óseo endurecible basado en CSH, el polvo de hidroxiapatito natural o  
producido sintéticamente se sinteriza a temperaturas por encima de 900 °C, por ejemplo a una temperatura entre  
900 y 1350 °C. Durante este proceso de sinterización el tamaño de los cristales del HA se incrementará, lo que  
50 disminuirá su solubilidad. Tras el proceso de sinterización, a menudo es necesario el tratamiento mecánico del  
material de HA (tal como cualquier tipo adecuado de micronización) para obtener un polvo de HA con la distribución  
correcta de tamaños de partículas para el uso en una pasta con un comportamiento adecuado. El polvo de HA  
sinterizado debería contener >90% de HA cristalino, preferiblemente un 95% o más, tal como un 99%. La expresión  
"hidroxiapatito cristalino", cuando se usa en el presente contexto, significa por tanto que el HA sinterizado consiste  
55 en >90% de HA cristalino, preferiblemente un 95% o más, tal como un 99% de HA cristalino.

Se ha descubierto sorprendentemente que el tratamiento mecánico del HA sinterizado, para obtener HA bruto  
pulverizado con la distribución correcta de tamaños de partículas, da como resultado un efecto retardante sobre el  
proceso de endurecimiento de una pasta de sustituto óseo basado en CSH, en el que CSH es el componente de

endurecimiento que experimenta una reacción de hidratación durante el endurecimiento, y el HA bruto pulverizado se usa como componente no endurecedor sólido que no experimenta una reacción de hidratación durante el endurecimiento. Esto se muestra en el Ejemplo 5.

5 Los inventores han descubierto sorprendentemente que la "pasivación" del HA cristalino sinterizado y tratado mecánicamente (HA bruto) mediante calentamiento durante un cierto tiempo dependiente de la temperatura elegida anula el efecto del tratamiento mecánico, como se muestra, p.ej., en el Ejemplo 5.

10 Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar un polvo de hidroxiapatito cristalino sinterizado pasivado (pHA) así como los productos obtenibles mediante tal método, y el método comprende proporcionar un primer polvo de HA bruto cristalino sinterizado (por ejemplo un polvo de HA disponible comercialmente) y calentar dicho polvo de 300 °C a 900 °C durante entre 10 minutos y 10 horas, preferiblemente de 300 °C a 600 °C durante entre 1 y 4 horas. El tratamiento térmico puede ser de 450 °C a 550 °C durante entre 1½ y 2½ horas, tal como 500 °C durante 2 horas.

15 El polvo de HA, bruto o pasivado, tiene un contenido cristalino de >90%, preferiblemente >95%, tal como >99% después del proceso de sinterización, que tiene lugar a una temperatura por encima de 900 °C, por ejemplo entre 900 y 1350 °C. Tras la micronización, el polvo tiene un tamaño de partícula de  $D(v,0,99) < 1000 \mu\text{m}$ , tal como  $< 200 \mu\text{m}$ , preferiblemente  $< 100 \mu\text{m}$  y más preferiblemente  $< 50 \mu\text{m}$ , tal como menos de  $35 \mu\text{m}$ . La superficie específica del polvo debería estar preferiblemente por debajo de  $20 \text{ m}^2/\text{g}$ , y más preferiblemente por debajo de  $10 \text{ m}^2/\text{g}$ , cuando se mide según el método BET (Brunauer, Emmett y Teller), que es un método para la determinación de la superficie total de un polvo expresada en unidades de área por masa de muestra ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) mediante la medida del volumen de gas (normalmente  $\text{N}_2$ ) adsorbido en la superficie de un peso conocido de la muestra de polvo. Se pueden aplicar otras maneras de determinar la superficie como alternativa.

20 La temperatura y la duración de la etapa de calentamiento necesarias para la pasivación se pueden ver influidas por varios parámetros que incluyen, pero sin limitación, las condiciones de sinterización previas, lo exhaustivo que haya sido el tratamiento mecánico, el tipo y medio de micronización, el crisol usado durante el calentamiento de pasivación, cuánto polvo se ha pasivado y lo rápido que el horno alcanza su temperatura de pasivación y se enfría. Por ejemplo, en ciertos casos, la duración y/o temperatura se pueden reducir si el tratamiento mecánico no ha sido exhaustivo.

25 Es posible determinar mediante experimentación rutinaria la temperatura y duración de la etapa de calentamiento, de forma que es suficiente pasivar el polvo de HA tratado mecánicamente según la presente invención. Una sugerencia de tal experimento rutinario que se puede aplicar a un HA que proporciona tiempos de endurecimiento clínicamente irrelevantes cuando se usa en sustitutos óseos de CSH/HA es la siguiente: fracciones de este HA se tratan térmicamente a diferentes temperaturas y durante diferentes tiempos, comenzando con temperaturas bajas y/o tiempos cortos de tratamiento térmico, y continuando hacia mayores temperaturas y/o tiempos más largos de tratamiento. Midiendo el tiempo de endurecimiento después de cada tratamiento térmico, es fácil decidir cuándo una temperatura mayor y/o un tratamiento más largo ya no proporciona una reducción adicional de los tiempos de endurecimiento, o cuándo el HA está lo suficientemente pasivado como para proporcionar tiempos de endurecimiento que se ajustan a la aplicación.

30 La duración mínima de la etapa de calentamiento en la pasivación se puede determinar de manera experimental, y depende de muchos factores, tales como la temperatura durante la pasivación, la temperatura de calentamiento durante la sinterización y el grado de tratamiento mecánico. La duración del tratamiento térmico de pasivación es de al menos 10 minutos, y preferiblemente al menos 1 hora. Preferiblemente, el tiempo de calentamiento es de entre 1 y 4 horas.

35 La pasivación se da más rápido cuanto mayor sea la temperatura. Así, en la presente invención, para reducir el tiempo de pasivación, la etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo por encima de 300 °C, por encima de 400 °C, o por encima de 500 °C.

40 Se ha descubierto que el tratamiento térmico prolongado del HA bruto a alrededor de 900-1000 °C o más puede provocar cambios indeseables en las propiedades del HA, tales como un incremento del pH y/o proporcionar un efecto de tamponamiento alcalino del HA pasivado en los medios acuosos que no se observaban antes del tratamiento térmico. Además, tales temperaturas elevadas pueden conducir a la aglomeración de los cristales, lo que conduce a la necesidad de etapas renovadas de micronización y pasivación. Así, para mantener las propiedades cruciales del HA, tales como el pH en disoluciones acuosas tras la pasivación, el tratamiento térmico de pasivación se da preferiblemente por debajo de 900 °C, tal como por debajo de 800 °C o por debajo de 700 °C. Para evitar cualquier propiedad indeseable del HA pasivado, puede ser ventajoso usar una temperatura tan baja como sea aplicable en la práctica sin un tiempo de calentamiento largo indeseable. El Ejemplo 8 muestra el efecto de la temperatura de calentamiento en la pasivación y el riesgo de que tenga una temperatura demasiado elevada sobre las propiedades de pH/tamponamiento. Preferiblemente, la temperatura de pasivación es de entre 300 y 600 °C.

45 También se ha descubierto que el polvo de HA es menos tamponador tras la pasivación que antes de ella. Dos ejemplos que muestran esto, con y sin aditivos, se muestran en el Ejemplo 6. Este efecto se puede usar para

monitorizar el efecto de pasivación del tratamiento térmico.

Se pueden prever todas las permutaciones de intervalos que implican el tiempo y la temperatura de calentamiento basándose en la presente descripción, así como repitiendo la etapa de calentamiento más de una vez, por ejemplo repitiendo la etapa de calentamiento 1, 2, 3 o 4 veces o más.

- 5 Se describen ejemplos específicos de etapas de calentamiento en los Ejemplos 4, 7 y 8.

En ciertas realizaciones, la etapa de calentamiento es, p.ej., de 300 °C a 600 °C durante entre 1 h y 4 h, p.ej. de 400 °C a 600 °C durante entre 1 h y 4 h, p.ej. de 450 °C a 550 °C durante entre 1½ h y 2½ h, p.ej. 500 °C ± 10 °C durante 2 h ± 15 min.

- 10 El HA pasivado se caracteriza además por un método en el que se investiga el pH/capacidad de tamponamiento estudiando cómo cambia el pH del HA/disolución acuosa cuando se añaden 100 µl de HCl 1 M cada 10 segundos a la suspensión.

- 15 Como se explicó anteriormente, se ha descubierto que el tratamiento prolongado a alrededor de 900-1000 °C o más puede provocar un efecto de tamponamiento alcalino que es indeseable en ciertas aplicaciones, porque se ha demostrado que un pH alcalino con capacidad de tamponamiento puede provocar hemólisis y/o desnaturalizar las proteínas, y por lo tanto es indeseable en las aplicaciones clínicas. Véase el Ejemplo 8.

- 20 Como se discutió anteriormente, los diferentes lotes de HA bruto sinterizado y micronizado poseen diferentes propiedades, que dependen del contenido, el origen y el tratamiento del HA bruto, y por lo tanto tienen diferentes requisitos para el tratamiento de temperatura/tiempo en el procedimiento de pasivación. Sin embargo, por razones prácticas, se podría introducir un tratamiento mínimo estándar. Una manera de determinar si el tratamiento de pasivación ha conducido al endurecimiento deseado y mejorado, es decir, una disminución del tiempo de endurecimiento, es comparar el tiempo de endurecimiento de dos sustitutos óseos endurecibles, es decir, dos pastas de sustitutos óseos endurecibles que comprenden al menos CSH, HA y una fase acuosa, en las que la única diferencia es el HA, que en un sustituto óseo endurecible es un primer HA bruto y en el otro sustituto óseo endurecible es el mismo HA bruto, sin embargo tras haber sido pasivado, por ejemplo tras 2 horas a 500 °C. La comparación se debería llevar a cabo en condiciones idénticas. Debería ser preferible obtener una reducción del tiempo de endurecimiento de al menos 3 minutos mediante el uso del HA pasivado en comparación con el HA bruto sin pasivar. Una manera de determinar el tiempo de endurecimiento puede ser mediante el uso de agujas Gillmore, en las que se determina el tiempo de endurecimiento inicial (IST) y el tiempo de endurecimiento final (FST). La reducción del tiempo de endurecimiento de menos de 3 minutos puede ser el resultado de un tratamiento de pasivación inadecuado del lote de HA bruto, o debido a que el lote de HA bruto permanece prácticamente inerte sin que se introduzca ninguna propiedad retardante del endurecimiento durante el proceso de sinterización y micronización. Dependiendo de la gravedad y magnitud de las propiedades retardantes del endurecimiento de un lote de HA bruto, la pasivación del lote puede reducir el tiempo de endurecimiento en más de 3 minutos, tal como 5 minutos o más, o 10 minutos o más, en comparación con el uso del lote de HA bruto sin pasivación.

- 35 Así, en una realización de la presente invención, la pasivación de dicho primer polvo de HA (bruto) provoca que se reduzca el tiempo de endurecimiento (tanto el tiempo de endurecimiento inicial (IST) como el tiempo de endurecimiento final (FST), medidos, p.ej., con agujas Gillmore) para una pasta de sustituto óseo endurecible que consiste en dicho polvo de hidroxiapatito pasivado (pHA), polvo de sulfato de calcio y un líquido acuoso, en condiciones idénticas, en al menos 3 minutos, tal como 5 minutos o más, por ejemplo 10 minutos o más, en comparación con el tiempo de endurecimiento para la misma pasta, que comprende sin embargo dicho primer polvo de HA bruto en vez de dicho polvo de HA pasivado.

Polvos para sustitutos óseos endurecibles

- 45 El HA pasivado (pHA) se puede usar en polvos para sustitutos óseos endurecibles, y por lo tanto un aspecto de la presente invención es proporcionar un polvo, que está listo para su uso en un sustituto óseo endurecible, que comprende como los dos componentes principales HA cristalino pasivado (pHA) como se describe en la presente memoria y CSH. La expresión "listo para su uso" significa que el polvo incluye HA pasivado (en contraste con el HA bruto sin pasivar, y por lo tanto preparado para el uso con una probabilidad elevada de que conduzca a tiempos de endurecimiento aceptables), de forma que solamente es necesario añadir un líquido acuoso, p.ej. agua, antes del uso en un tratamiento clínico, tal como en el tratamiento de una enfermedad del tejido de sostén, que en general implica cirugía.

El polvo listo para su uso no comprende una fase acuosa, y es un polvo seco. El CSH puede existir en una forma alfa-CSH y una beta-CSH. En ciertas realizaciones, el CSH es alfa-CSH, ya que esta forma cristalina forma a menudo una superestructura más fuerte cuando se mezcla con una fase acuosa. En una realización preferida, el CSH es el único componente presente en el polvo que se endurece mediante hidratación.

- 55 El CSH y HA cristalino pasivado (pHA) están presentes como los componentes principales en el polvo listo para su uso, lo que significa que estos componentes son los dos mayores componentes al medirlos en porcentaje en peso (%p). Por lo tanto, en una realización, el HA cristalino pasivado (pHA) está presente en el intervalo del 20-80 %p del

peso total de los componentes del polvo, y el CSH está presente en el intervalo del 80-20 %p del peso total de los componentes del polvo.

5 En otra realización de la invención, hay presentes uno o más aceleradores en el polvo listo para su uso, tales como, p.ej. en una cantidad de hasta un 10 %p del peso total de los componentes del polvo, cuyo(s) acelerador(es) aumentará(n) la velocidad de la reacción de endurecimiento de CSH por su presencia, y así acortarán el tiempo de endurecimiento. Un acelerador es sulfato de calcio (CSD) dihidrato. Otros ejemplos son sales adecuadas, por ejemplo, sales inorgánicas, tales como sales de cloruro y sulfato, por ejemplo cloruro sódico. Preferiblemente, el sulfato de calcio dihidrato puede constituir hasta el 10 %p, tal como hasta el 5 %p, 2 %p, o 1 %p del peso total de los componentes del polvo. En una realización particular, los componentes del polvo consisten en un 59,6 %p de alfa-CSH, 40,0 %p de HA cristalino pasivado y 0,4 %p de sulfato de calcio dihidrato.

10 En otra realización de la presente invención, el polvo listo para su uso consiste en HA pasivado en el intervalo del 35-45 %p del peso total de los componentes del polvo, CSH en el intervalo del 55-65 %p del peso total de los componentes del polvo, y sulfato de calcio dihidrato en el intervalo del 0-5 %p, preferiblemente 0-2 %p del peso total de los componentes del polvo, y opcionalmente hasta un 10 %p de otros componentes/aditivos. Tales otros componentes/aditivos pueden incluir, pero sin limitación, agentes bioactivos, modificadores de la viscosidad orgánicos e inorgánicos, tales como almidones, alginatos, derivados de celulosa, y similares, y/o aditivos para acelerar/retardar el endurecimiento del sulfato de calcio.

#### Sustitutos óseos endurecibles

20 En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan métodos para preparar sustitutos óseos endurecibles mediante el uso del HA cristalino pasivado según la presente invención, así como el uso de HA cristalino pasivado según la presente invención, en la preparación de un sustituto óseo endurecible.

25 El HA cristalino pasivado según la presente invención y los polvos de la presente invención que comprenden el HA pasivado se pueden usar en pastas de sustitutos óseos endurecibles, tales como para la fabricación de microesferas o cualquier forma fabricada a medida para el uso en el tratamiento de trastornos del tejido de sostén, o en el uso como una pasta de sustituto óseo endurecible inyectable para la aplicación, p.ej. para inyección, en el lugar de tratamiento de trastornos del tejido de sostén en un paciente humano o no humano.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una pasta de sustituto óseo endurecible, tal como una pasta de sustituto óseo endurecible que comprende el polvo listo para su uso según la presente invención, mezclada con un líquido acuoso.

30 La pasta según la presente invención se hace mezclando un líquido acuoso, que en su forma más simple es agua, junto con el polvo listo para su uso para preparar la pasta. En una realización, la pasta final se hace añadiendo uno o más aditivos en diferentes etapas, tal como disolviendo el aditivo en el líquido antes de mezclarlo con el polvo, y/o mediante mezcla retardada como se describió en el documento WO 2011/098438.

35 La proporción de mezcla para el polvo y la fase acuosa se denomina proporción líquido a polvo (L/P). En ciertas realizaciones de la presente invención, la L/P está en el intervalo de 0,2-0,6 ml/g, tal como entre 0,3 y 0,5 ml/g. En una realización específica, la proporción L/P es 0,43 ml/g o 0,5 ml/g. Se puede emplear una proporción L/P inferior, tal como entre 0,2 y 0,4 ml/g para reducir adicionalmente el IST y FST, sin embargo una proporción L/P inferior también puede reducir la inyectabilidad de la pasta, lo cual es negativo para varias aplicaciones clínicas.

40 En una realización de la presente invención, el líquido acuoso es agua, y en otras realizaciones la fase acuosa comprende una o más sal(es) adecuada(s), tal(es) como una sal de cloruro o sulfato, por ejemplo cloruro sódico, un agente de contraste de rayos X no iónico hidrosoluble, y/o uno o más agentes bioactivos.

La adición de cloruro sódico a la fase acuosa, tal como 0,9 mg de cloruro sódico/ml de líquido, actúa como acelerante de la hidratación de sulfato de calcio, y de ese modo contribuye a una reducción de IST/FST.

45 La adición de uno o más agentes de contraste de rayos X no iónicos hidrosolubles es ventajosa, ya que ofrece la posibilidad de monitorizar la pasta mediante rayos X durante y después del procedimiento quirúrgico. Los ejemplos de agentes de contraste de rayos X adecuados son los compuestos de iohexol como se describen en el documento WO 03/05388. Se proporcionan agentes de contraste de rayos X no iónicos hidrosolubles adecuados adicionales, así como sus concentraciones, en el documento WO 03/05388. El agente de contraste de rayos X se disuelve en agua pura solo o junto con aditivos adecuados en forma, p.ej. de tampones y/o agentes quelantes. En un ejemplo, el líquido comprende Tris (tris(hidroximetil)aminometano), HCl y EDTA de calcio, además del agente de rayos X, tal como iohexol. Se conocen en la técnica otros aditivos de agentes de rayos X similares. Un kit para formar una pasta de sustituto óseo endurecible según la presente invención puede comprender, además del polvo listo para su uso, una disolución líquida, p.ej. agua que comprende un agente de rayos X y aditivos adecuados, en un recipiente diferente, o el agente y opcionalmente los aditivos pueden estar en un recipiente para disolverlos en el líquido antes del uso.



El agente de contraste de rayos X no iónico hidrosoluble adecuado se puede seleccionar de iohexol, iodixanol, ioversol, iopamidol, iotrolano, metrizamida, iodecimo, iogluco, iogluca, ioglu, ioglu, ioglu, iomepro, iopentol, iopromida, iosarc, iosimida, iotusa, ioxilano, iofrotal, e iodecol.

5 Como alternativa a los agentes de contraste de rayos X no iónicos hidrosolubles, se pueden usar partículas biodegradables que comprenden un agente de contraste de rayos X biocompatible y biodegradable, como se describe en el documento WO 2009/081169, para proporcionar radiopacidad al sustituto óseo de la presente invención. Estas partículas se añaden al polvo cerámico antes de la adición del líquido.

10 Las partículas de agentes de contraste de rayos X biodegradables pueden ser escindibles, preferiblemente escindibles enzimáticamente, derivadas de un agente de contraste de rayos X de organoyodo fisiológicamente tolerable, o las partículas de agentes de contraste de rayos X biodegradables se pueden preparar a partir de polímeros biodegradables que comprenden compuestos de agentes de contraste de rayos X de organoyodo biocompatibles. Se puede considerar que los agentes de contraste de rayos X biodegradables son derivados insolubles en agua de los compuestos de organoyodo correspondientes en el sentido de que la escisión (por ejemplo, mediante las esterasas del organismo) libera compuestos de organoyodo fisiológicamente tolerables.

15 Un aspecto del uso de partículas biodegradables que comprenden un agente de contraste de rayos X biocompatible y biodegradable es la naturaleza particulada y la solubilidad limitada en agua de tales compuestos de organoyodo. Inicialmente tras el endurecimiento del material de sustituto óseo, el agente de contraste de rayos X biodegradable nuevo permanecerá en forma de partículas intactas en la matriz de cemento. A continuación, la degradación de las partículas de agente de contraste hasta compuestos de organoyodo biocompatibles hidrosolubles contribuirá a la estructura macroporosa osteoconductora, osteoinductora y reabsorbible beneficiosa del material de sustituto óseo.

Los derivados especialmente preferidos de los compuestos de organoyodo fisiológicamente tolerables para el uso según la invención incluyen los análogos de agentes de contraste de rayos X de organoyodo iónicos, no iónicos, monoméricos o diméricos conocidos en los que los grupos carboxílicos solubilizantes están esterificados con alcoholes, los grupos hidroxilo están acilados (p.ej. acetilados) o transformados en grupos 2,4-dioxaciclopentan-1-ilo.

25 Las partículas de agentes de contraste de rayos X biodegradables se pueden seleccionar del grupo que comprende derivados escindibles de ácido diatrizoico, iobenguano, ácido iobenzámico, iobitriol, ácido iocármico, ácido iocetámico, iodamida, iodipamida, iodixanol, aceite yodado, ácido yodoalfónico, p-yodoanilina, ácido o-yodobenzoico, yodoclorhidroxiquina, o-yodohipurato sódico, o-yodofenol, p-yodofenol, yodoftaleína sódica, yodopsina, iodpiracet, yodopirrol, yodoquinol, ácido ioglicámico, iohexol, ácido iomeglámico, iomepro, iopamidol, ácido iopanoico, iopentol, iofendilato, ácido iofenólico, iopromida, ácido ioprónico, iopidol, iopidona, ácido iotalámico, iotrolan, ioversol, ácido ioxiglicámico, ácido ioxálico, ioxilano e ipodato.

30 Los ejemplos de polímeros biodegradables adecuados para la inclusión de un agente de rayos X son: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ε-caprolactona) (PCL), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(lactida-co-glicolida) (PLGA), poli(dioxanona), poli(glicolida-co-carbonato de trimetileno), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidina), poli(hidroxi-butaratos), poli(hidroxi-valerato), poli(anhídrido de ácido sebáico-co-ácido hexadecanodioico), poli(carbonato de trimetileno), poli(ortoéster), poli(caprolactamas), poli(acrilamidas), poli(tereftalato), poliéter amidas en bloque (PEBA), poli(uretano), polisacáridos como polímeros de celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polímeros naturales como alginatos, quitosanos, gelatinas, etc. También pueden ser adecuadas las mezclas de polímeros, aleaciones, homopolímeros, copolímeros aleatorios, copolímeros en bloque y copolímeros de injerto.

#### Agentes bioactivos como aditivos

La adición de agentes bioactivos al polvo o fase acuosa podrá proporcionar propiedades beneficiosas adicionales a los sustitutos óseos endurecibles. En una realización de la presente invención, se añade(n) uno o más agente(s) bioactivo(s) a la fase acuosa, y en ciertas realizaciones estos agentes bioactivos se seleccionan del grupo que consiste en: antibióticos (que incluyen fármacos antifúngicos), agentes quimioterápicos, vitaminas, hormonas, agentes citostáticos, bisfosfonatos, factores de crecimiento, proteínas, péptidos, aspirado de médula ósea, plasma rico en plaquetas y hueso desmineralizado. Se puede añadir sílice, zirconio, estroncio, y similares para estimular la cicatrización ósea. La adición de agentes bioactivos al sustituto óseo endurecible dará como resultado una formulación de liberación lenta localizada, en la que el agente bioactivo se liberará a lo largo del tiempo. En otra realización de la presente invención, se añade(n) uno o más agente(s) bioactivo(s) al polvo listo para su uso antes o en el momento de mezclarlo con el líquido. Los diferentes agentes se pueden aplicar también en diferentes fases y/o en diferentes momentos. Un kit para formar una pasta de sustituto óseo endurecible según la presente invención puede comprender, además del polvo listo para su uso, uno o más recipientes que contienen el/los agente(s) bioactivo(s) a añadir a la disolución líquida antes del uso, o a la pasta durante el uso.

55 Cuando el agente bioactivo es un antibiótico, el sustituto óseo endurecible puede ser eficaz para prevenir o tratar la osteomielitis. Existe un gran interés en añadir antibióticos a los sustitutos óseos para prevenir las infecciones óseas en los pacientes tratados. Como se discutió anteriormente, los ensayos previos en el laboratorio han demostrado, sin embargo, que la adición de antibióticos afecta de manera significativa a las propiedades de la pasta, principalmente

por un tiempo de endurecimiento prolongado. Para acortar el tiempo de endurecimiento de estas pastas, se ha demostrado que es eficaz el uso de HA cristalino pasivado según la presente invención.

5 Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la presente invención, el/los agente(s) antibiótico(s) que pertenecen a los siguientes grupos pueden formar parte de manera ventajosa del sustituto óseo endurecible según la presente invención: el grupo que consiste en antibióticos aminoglicósidos, el grupo que consiste en penicilinas, el grupo que consiste en cefalosporinas, rifampicina, clindamicina y el grupo que consiste en fármacos antifúngicos. Preferiblemente, el/los agente(s) antibiótico(s) se selecciona(n) de la lista que consiste en: gentamicina, vancomicina, tobramicina, cefazolina, rifampicina, clindamicina, nistatina, griseofulvina, anfotericina B, cetoconazol y miconazol. Una de las ventajas de incorporar un antibiótico en la pasta de sustituto óseo endurecible según la  
10 presente invención es que se forma una formulación de liberación lenta localizada, con una concentración local mucho mayor del antibiótico de la que sería posible mediante el tratamiento sistémico con el mismo antibiótico.

En una realización específica de la presente invención, la fase acuosa comprende el agente antibiótico sulfato de gentamicina, hidrocloreuro de vancomicina y/o cefazolina. Para estos agentes antibióticos, se ha demostrado que los sustitutos óseos endurecibles según la presente invención (es decir, con HA pasivado) proporcionan una reducción del IST y FST (véanse los Ejemplos 9, 10 y 11) en comparación con la aplicación de estos agentes antibióticos en un sustituto óseo endurecible sin HA pasivado según la presente invención.  
15

El HA pasivado forma parte de un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso, cuyo polvo, después de mezclarlo con un líquido, está listo para su uso en el tratamiento clínico, p.ej. como parte de un tratamiento quirúrgico, para tratar trastornos del tejido de sostén en un sujeto humano o no humano mediante la regeneración del tejido óseo perdido y/o el tratamiento de las infecciones óseas. Tales trastornos pueden ser osteopenia, fractura ósea, traumatismo óseo y/u osteomielitis.  
20

Kits para preparar sustitutos óseos endurecibles

Los polvos de sustituto óseo listo para su uso según la presente invención, así como el o los líquidos acuosos para el uso en la preparación de la pasta de sustituto óseo, se pueden proporcionar de manera ventajosa en forma de un kit, que está listo para su uso y requiere un mínimo de manipulación de los diversos componentes para obtener un intervalo óptimo de tiempos y viscosidades para aplicar el sustituto óseo endurecible en forma de una pasta inyectable al paciente, y para minimizar la introducción de bacterias del entorno.  
25

Por lo tanto, la presente invención proporciona en otro aspecto de la invención un kit para preparar un sustituto óseo endurecible, que comprende un polvo listo para su uso según la presente invención colocado en un dispositivo combinado de mezcla e inyección. Tales dispositivos combinados de mezcla e inyección (dispositivos CMI) se conocen en la técnica anterior, p.ej. del documento WO 2005/122971. En una realización, el kit comprende además en uno o más recipiente(s) diferente(s), una o más disolución(es) acuosa(s) que comprende(n) opcionalmente uno o más acelerantes y/o uno o más agente(s) bioactivo(s), y/o uno o más agente(s) de contraste de rayos X no iónico(s); y opcionalmente instrucciones para el uso de dicha mezcla y dispositivo de inyección. El/los acelerante(s), agente(s) bioactivo(s) y/o agente(s) de contraste de rayos X no iónico(s) o partículas de rayos X biodegradables se pueden incluir en el kit en recipientes diferentes. El kit puede comprender además un dispositivo combinado de mezcla e inyección.  
30  
35

## Ejemplos

### *Materiales y Métodos*

40 Especificaciones de las materias primas según las normas

#### Polvos

Todas las muestras de HA usadas en los ejemplos se han producido mediante una reacción de precipitación, y han cumplido la especificación ASTM F 1185 "Especificación Estándar para la Composición de Hidroxilapatito para Implantes Quirúrgicos" e ISO 13779-1 "Implantes para Cirugía -- Hidroxilapatito -- Parte 1: Hidroxilapatito cerámico".

45 Las purezas de CSH y CSD usados en los ejemplos cumplen los requisitos de ensayo indicados en la monografía "Sulfato de Calcio Dihidrato" 0982, Farmacopea Europea, y en la "Monografía Oficial para Sulfato de Calcio" Farmacopea/Vademécum Nacional de EE.UU.

#### Fase líquida

50 En los Ejemplos, se han usado disoluciones de iohexol (de diferentes concentraciones) o solución salina como fase líquida.

Las disoluciones de iohexol usadas consisten en agua para inyección (API), iohexol, el tampón de trometamol (Tris: tris(hidroximetil)aminometano), el agente quelante edetato de calcio disódico (EDTA de calcio) y ácido clorhídrico (HCl). Las disoluciones de iohexol cumplen los requisitos indicados en la Farmacopea de EE.UU. para Inyección de iohexol. Además, el contenido de iohexol, trometamol y edetato de calcio disódico cumple cada requisito específico

según las normas.

La solución salina consiste en un 0,9 %p de NaCl en agua para inyección (API). La unidad cumple los requisitos indicados en la Ph EP 0193 para Cloruro de Sodio.

- 5 La razón de tener una disolución que comprende iohexol o un agente de rayos X similar como fase líquida es incrementar la radiopacidad del material de sustituto óseo (véase el documento WO 03/053488).

Polvo de referencia para un sustituto óseo endurecible

El polvo para el sustituto óseo endurecible usado en los ejemplos presentados consistió en un 59,6 %p de  $\alpha$ -CSH, 0,4 %p de CSD y 40,0 %p de HA, pero la proporción L/P y el tipo de líquido usado para mezclar las muestras varió.

Medida de los tiempos de endurecimiento inicial y final

- 10 Los tiempos de endurecimiento se midieron con agujas Gillmore según un método basado en la norma ASTM C266. Después de preparar la pasta para el sustituto óseo endurecible, cierta cantidad de ella se transfirió a tres moldes circulares ( $\varnothing = 10$  mm,  $h = 5$  mm) y la superficie se aplanó. Las dos agujas Gillmore ejercen una presión de 0,3 y 5 MPa, respectivamente, y la aguja de 0,3 MPa se coloca regularmente (aproximadamente una vez por minuto) sobre las muestras hasta que ya no deja marca. El momento en el que la aguja de 0,3 MPa no deja marca en la superficie
- 15 del material de los moldes se indica como *tiempo de endurecimiento inicial*, IST. Después, se repite el mismo procedimiento con la aguja de 5 MPa, y el momento en el que esta aguja tampoco deja marca se indica como *tiempo de endurecimiento final*, FST.

Medida del pH y ensayo de la capacidad de tamponamiento

- 20 El método usado para investigar la capacidad de tamponamiento de los polvos de HA se basó en la preparación de una suspensión espesa con 3,2 g de polvo de HA en 32 g de agua. Después de mezclar el HA con agua, se añadieron 100  $\mu$ l de HCl 1 M cada 10 segundos con agitación continua. El pH se midió y se anotó durante todo el procedimiento, y el valor de pH justo antes de que comenzaran las adiciones de HCl se indicó como el pH del HA. Si el HCl se añadiese a agua pura, se podría esperar una disminución rápida del pH, pero la presencia del polvo de HA retrasará la disminución en diferentes grados.

- 25 Ejemplo 1 - Diferencias en el comportamiento de endurecimiento de un sustituto óseo de CSH/HA dependiendo de las variaciones entre lotes de HA

En este estudio se evaluaron 7 lotes diferentes de HA del mismo productor de HA. Todos los lotes se habían producido mediante sinterización a  $1275 \pm 50$  °C durante 4 h y después se habían micronizado. La distribución de tamaños de partículas y la superficie específica fueron similares para los 7 lotes de HA (tamaño medio de partículas:

30  $\sim 5$   $\mu$ m y S.E.:  $\sim 1,5$ -2  $m^2/g$ ). Estos lotes diferentes de HA se usaron para preparar un material de sustituto óseo de CSH/HA.

- 35 Una mezcla de un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 80  $\mu$ m y tamaño medio de partículas  $\sim 9$   $\mu$ m), 40,0 %p de HA bruto (lotes diferentes del mismo productor, véase anteriormente) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55  $\mu$ m) se mezclaron con una fase líquida que contenía iohexol (180 mg l/mL). Se mezclaron 30 g de la mezcla de polvo cerámico con 15 mL de disolución de iohexol (es decir, una proporción líquido/polvo de 0,5 mL/g). La mezcla se llevó a cabo durante 30 segundos mediante el uso de un dispositivo de mezcla e inyección especialmente diseñado (documento WO 2005/122971). Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore (norma ASTM C266).

- 40 Los resultados de la siguiente tabla muestran que el comportamiento de endurecimiento del sustituto óseo de CSH/HA puede variar ampliamente dependiendo de los lotes de HA usados, incluso si no se puede observar ninguna diferencia entre los lotes mediante los análisis químicos/físicos habituales. Como se puede observar, los tiempos de endurecimiento del sustituto óseo se retardan significativamente mediante el uso de un lote de HA específico, desde un tiempo de endurecimiento inicial (IST) de 9 min hasta 56 minutos, dependiendo del lote de HA
- 45 usado.

Lote de HA contenido	IST/min	FST/min
1	56 $\pm$ 0	107 $\pm$ 2
2	9 $\pm$ 0	23 $\pm$ 2
3	21 $\pm$ 0	41 $\pm$ 0
4	29 $\pm$ 0	65 $\pm$ 0
5	31 $\pm$ 0	65 $\pm$ 0

Lote de HA contenido	IST/min	FST/min
6	20 ± 0	52 ± 1
7	17 ± 0	43 ± 6

Ejemplo 2 - Variaciones ampliadas en el comportamiento de endurecimiento de los sustitutos óseos de CSH/HA cuando hay presentes antibióticos

5 En este estudio se seleccionaron 3 lotes diferentes de HA bruto (A-C) del mismo productor después de un pre-ensayo inicial como se describió en el Ejemplo 1, ya que el sustituto óseo de CSH/HA resultante proporcionó resultados de endurecimiento aceptables. Todos los lotes se habían producido mediante sinterización a  $1275 \pm 50$  °C durante 4 h y después se habían micronizado. La distribución de tamaños de partículas y la superficie específica fueron similares para los 3 lotes de HA (tamaño medio de partículas:  $\sim 5 \mu\text{m}$  y S.E.:  $\sim 1,5\text{-}2 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

10 El objetivo del estudio fue evaluar el efecto sobre el tiempo de endurecimiento del sustituto óseo de CSH/HA, que contenía diferentes lotes de HA, al añadir el antibiótico vancomicina al sistema. Se disolvieron 500 mg de vancomicina (como hidrocloreto de vancomicina) en la fase líquida antes de mezclarla con los polvos cerámicos.

15 Una mezcla de un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 80  $\mu\text{m}$  y tamaño medio de partículas  $\sim 9 \mu\text{m}$ ), 40,0 %p de HA bruto (lotes diferentes del mismo productor, véase anteriormente) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55  $\mu\text{m}$ ) se mezclaron con una fase líquida que contenía iohexol (180 mg l/mL). Se mezclaron 18,5 g de la mezcla de polvo cerámico con 8 mL de líquido (disolución de iohexol pura o disolución de iohexol premezclada con vancomicina, véase anteriormente), lo que proporcionó una proporción líquido/polvo de 0,43 mL/g. La mezcla se llevó a cabo durante 30 segundos mediante el uso de un dispositivo de mezcla e inyección especialmente diseñado (documento WO 2005/122971). Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore (norma ASTM C266).

20 La siguiente tabla muestra el tiempo de endurecimiento con y sin la adición de hidrocloreto de vancomicina para tres composiciones de CSH/HA.

Lote de HA contenido	Sin antibióticos añadidos		1,7* %p de vancomicina HCl	
	IST/min	FST/min	IST/min	FST/min
A	10,5 ± 0,6	20,2 ± 1,5	12,0 ± 0	18,7 ± 1,2
B	14,2 ± 1,4	24,9 ± 1,5	>60	>60
C	10,9 ± 0,7	21,3 ± 2,4	>60	>60

\* 1,7 %p basado en el peso de la pasta. 2,7 %p de vancomicina HCl basado en el peso del polvo.

25 Como se puede observar, existe una diferencia importante en los tiempos de endurecimiento de los sustitutos óseos de CSH/HA al añadir hidrocloreto de vancomicina dependiendo del lote de HA bruto que se usó. Se demostró que sin antibiótico añadido, los 3 sistemas diferentes (con diferentes lotes de HA bruto) proporcionaron un comportamiento de endurecimiento similar. Los tres lotes de HA bruto se habían seleccionado después de un pre-ensayo inicial como se describió en el Ejemplo 1, y, sin antibiótico añadido, los tres lotes de HA bruto proporcionaron un resultado aceptable. Con el antibiótico presente, solamente uno de los tres lotes de HA bruto proporcionaron un comportamiento de endurecimiento aceptable. Para dos de los sistemas, el endurecimiento se retardó claramente y el tiempo de endurecimiento inicial no se alcanzó en 1 hora.

Ejemplo 3 Efecto del HA sobre la hidratación de CSH en sistemas que contienen antibióticos

35 Para evaluar el efecto del HA bruto cristalino sinterizado en el comportamiento de endurecimiento de CSH, se prepararon dos tipos diferentes de sustitutos óseos; uno con HA bruto y uno sin HA. Los ensayos se llevaron a cabo con y sin antibióticos (vancomicina o sulfato de gentamicina) añadidos a los dos tipos de sustitutos óseos. El lote de HA se seleccionó tras un pre-ensayo inicial como se describió en el Ejemplo 1 y sin antibiótico añadido, y el lote de HA proporcionó un resultado de endurecimiento aceptable para el sustituto óseo de CSH/HA.

40 Se mezclaron 18,5 g de polvo cerámico con 8 mL de disolución de iohexol (es decir, una proporción líquido/polvo de 0,43 mL/g) con una concentración de yodo de 180 mg l/mL. El primer tipo de sustituto óseo cerámico consistió solamente en una mezcla del 99,3 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 80  $\mu\text{m}$  y tamaño medio de partículas  $\sim 7 \mu\text{m}$ ) y 0,67 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55  $\mu\text{m}$ ). En el segundo tipo de HA bruto de sustituto óseo también estuvo presente (59,6 %p de CSH, 40 %p de HA y 0,4 %p de CSD). El polvo de HA bruto fue comercial, y se había sinterizado a  $1275 \pm 50$  °C durante 4 horas y después se había micronizado. La distribución de tamaños de partículas fue de 0,1-40  $\mu\text{m}$ , con un tamaño medio de partículas de  $\sim 7 \mu\text{m}$ .

45

La fase líquida contuvo solamente la disolución de iohexol o las disoluciones de iohexol con 1 g del antibiótico (vancomicina o sulfato de gentamicina) disuelto.

5 La mezcla de los polvos cerámicos (que contenían HA o no) y la disolución de iohexol (que contenía el antibiótico o no) se llevó a cabo durante 30 segundos mediante el uso de un dispositivo de mezcla e inyección diseñado especialmente (documento WO 2005/122971). Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore.

10 En la siguiente tabla se muestran los tiempos de endurecimiento de los dos sustitutos óseos con o sin dos tipos diferentes de antibióticos. Como se puede observar, se consiguieron tiempos de endurecimiento clínicamente irrelevantes solamente en los casos en los que se añadieron los antibióticos a la composición que contenía HA. Así, los aditivos ensayados no retardan solos los tiempos de endurecimiento del CSH, sino solamente en combinación con el polvo de HA bruto. El resultado demuestra que el endurecimiento retardado obtenido cuando se añaden los antibióticos al sistema está relacionado con la presencia del hidroxiapatito cristalino.

Fase de polvo	Sin antibióticos añadidos		3,4* %p de vancomicina HCl		3,4* %p de Sulfato de Gentamicina	
	IST/min	FST/min	IST/min	FST/min	IST/min	FST/min
CSH y CSD	4	10,3	3	7	3	7,2
CSH, CSD y HA	8	16,5	>60	>60	>60	>60

\* La concentración se basa en la pasta. La concentración es del 5,4 %p respecto del polvo.

15 Ejemplo 4 Diferencia en los tiempos de endurecimiento de pastas de CSH/HA que contienen HA antes y después de la pasivación

20 En este estudio se usaron 3 lotes diferentes de HA (D-F) del mismo productor. Todos los lotes se habían producido mediante sinterización a  $1275 \pm 50$  °C durante 4 h y después se habían micronizado. La distribución de tamaños de partículas y la superficie específica fueron similares para los 3 lotes de HA (tamaño medio de partículas:  $\sim 5$   $\mu\text{m}$  y S.E.:  $\sim 1,5\text{-}2$   $\text{m}^2/\text{g}$ ). Los tres lotes de HA se seleccionaron después de un pre-ensayo inicial como se describió en el Ejemplo 1, y dieron resultados inaceptables de endurecimiento del sustituto óseo de CSH/HA, incluso sin antibiótico añadido.

Se realizaron ensayos en los que los polvos de HA fueron HA bruto o HA bruto que además se había sometido a tratamiento térmico a 500° C durante 2 horas (pHA).

25 La mezcla de polvo cerámico consistió en un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 80  $\mu\text{m}$  y tamaño medio de partículas  $\sim 9$   $\mu\text{m}$ ), 40,0 %p de HA (bruto o pasivado) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55  $\mu\text{m}$ ). El polvo cerámico se mezcló con una fase líquida que contenía iohexol (180 mg l/mL). Se mezclaron 18,5 g de la mezcla de polvo cerámico con 8 mL de disolución de iohexol (es decir, una proporción líquido/polvo de 0,43 mL/g). La mezcla se llevó a cabo durante 30 s mediante el uso de un dispositivo de mezcla e inyección especialmente diseñado (documento WO 2005/122971). Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore.

30 En la tabla siguiente, se presentan los tiempos de endurecimiento de sustitutos óseos que contenían diferentes lotes de HA antes y después de la pasivación. Como se puede observar, los tiempos de endurecimiento de las pastas de CSH/HA que contenían los tres lotes de HA proporcionaron tiempos de endurecimiento inicial en el intervalo de 27-39 min cuando los polvos de HA no se habían pasivado, y por lo tanto superaron los valores clínicamente relevantes. 35 Tras la pasivación del HA a 500 °C durante 2 horas, el tiempo de endurecimiento inicial disminuyó hasta aproximadamente 10 minutos, es decir, aproximadamente 1/3 de los valores iniciales. Los tres lotes de HA proporcionaron tras la pasivación el mismo comportamiento (clínicamente relevante) de la pasta de sustituto óseo.

Lote de HA contenido	Antes de la pasivación		Después de la pasivación (500 °C, 2 h)	
	IST/min	FST/min	IST/min	FST/min
D	27,1 $\pm$ 3,1	44,3 $\pm$ 4,6	9,8 $\pm$ 0,8	18,1 $\pm$ 1,1
E	39,0 $\pm$ 0,9	57,9 $\pm$ 5,4	8,9 $\pm$ 0,9	16,2 $\pm$ 1,0
F	34,4 $\pm$ 1,5	59,3 $\pm$ 5,2	10,2 $\pm$ 1,5	20,9 $\pm$ 1,2

Ejemplo 5 - El efecto de la micronización sobre el efecto retardante de HA en el endurecimiento de CSH

40 Para entender adicionalmente qué provoca el efecto retardante que el hidroxiapatito tiene sobre el endurecimiento de sulfato de calcio hemihidrato, se llevó a cabo un estudio con el uso de un polvo de hidroxiapatito comercial

(Riedel-de-Haën, Alemania), que no se había sinterizado. El polvo de HA se sinterizó a 1250 °C durante 3 horas en BONESUPPORT. Después de la sinterización del polvo de HA, se trató de diferentes maneras:

- Se trituró cuidadosamente (tamaño de partículas de algunos milímetros)
- Se molió con bolas (tamaño de partículas < 200 µm)
- 5 - Se molió con bolas y después se trató térmicamente a 360 °C durante 10 h (tamaño de partículas < 200 µm)
- Se trató térmicamente a 360 °C durante 10 h y finalmente se molió con bolas (tamaño de partículas < 200 µm)

La mezcla de polvo cerámico consistió en un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 a 80 µm y tamaño medio de partículas ~ 9 µm), 40,0 %p de HA bruto (de cualquiera de los tipos descritos anteriormente) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55 µm). El polvo cerámico se mezcló con una fase líquida que contenía iohexol (300 mg l/mL). Se mezclaron 3,0 g de la mezcla de polvo cerámico con 1,5 mL de disolución de iohexol (es decir, una proporción líquido/polvo de 0,5 mL/g). La mezcla de estas muestras pequeñas se llevó a cabo durante 60 segundos mediante el uso de una cuchara en un vaso de precipitados. Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore (norma ASTM C266).

15 Como se puede observar en la siguiente tabla, el HA que se había molido tras la sinterización y tras la etapa de sinterización y tratamiento térmico retardó el endurecimiento de sulfato de calcio mucho más que el HA sin moler y el HA que se había sometido a un tratamiento térmico tras la molienda con bolas. Los resultados demuestran que la etapa de molienda con bolas de HA provoca su efecto retardante sobre el sustituto óseo de CSH/HA. Esto apoya la teoría de que las fuerzas mecánicas aplicadas al HA durante la molienda son responsables del retardo del sulfato de calcio.

Tratamiento del HA	IST	FST
Sinterización a 1250 °C durante 3 horas y trituración cuidadosa	11 min	22 min
Sinterización a 1250 °C durante 3 h y molienda con bolas	> 2 h	> 2 h
Sinterización a 1250 °C durante 3 h, molienda con bolas, tratamiento térmico a 360 °C 10 h	11 min	26 min
Sinterización a 1250 °C durante 3 h, tratamiento térmico a 360 °C 10 h, molienda con bolas	> 2 h	> 2 h

#### Ejemplo 6 - Cambio en la capacidad de tamponamiento tras la pasivación del HA

Se investigaron varios métodos de análisis diferentes para identificar qué propiedades del polvo de HA bruto se vieron afectadas durante la etapa de pasivación. Se midió el pH y la capacidad de tamponamiento para el mismo lote de HA antes y después de la pasivación. El método de "ensayo del pH y la capacidad de tamponamiento" muestra una diferencia cuando se investigan los polvos de HA antes y después del tratamiento térmico.

En este estudio, se analizó el pH/capacidad de tamponamiento de un polvo de HA bruto comercial, sinterizado (1275 °C durante 4 horas) y micronizado (distribución de tamaños de partículas: 0,1-40 µm, tamaño medio de partículas ~ 7 µm), antes y después de la pasivación (es decir, tratamiento térmico a 500 °C durante 2 horas).

30 Como se puede observar a partir de la Figura 2, la muestra con el HA antes de la pasivación tiene una resistencia mayor al cambio del pH cuando se añade HCl que la que tiene la muestra con el HA pasivado.

Se ha demostrado que el efecto de retraso que tienen los polvos de HA bruto sobre el endurecimiento de CSH antes de la pasivación es más pronunciado cuando hay presentes ciertos aditivos, tales como antibióticos. Por lo tanto, se repitió el ensayo de la capacidad de tamponamiento con la presencia de hidrócloruro de vancomicina (13,5 mg/ml). Los resultados se presentan en la Figura 3, y demuestran que la diferencia en la resistencia contra el cambio del pH provocado por la adición de HCl es mayor para el polvo de HA bruto antes de la pasivación (HA A) que después (HA B).

Se usó el mismo lote de HA en las dos medidas presentadas, pero en la primera el polvo de HA se pasivó a 500 °C durante 1 hora, y en la segunda a 500 °C durante dos horas.

40 Ejemplo 7 - Efecto de la temperatura de pasivación

Se trató térmicamente un polvo de HA bruto comercial, sinterizado (1275 °C durante 4 h) y micronizado (distribución de tamaños de partículas: 0,1-20 µm, tamaño medio de partículas ~ 3 µm) a diferentes temperaturas (400-600 °C) y tiempos (1-3 horas) y después se mezcló en la mezcla de polvo cerámico para determinar el efecto sobre el endurecimiento de la pasta basada en CSH.

- 5 Una mezcla de polvo cerámico consistió en un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas de 0,1 - 80 µm y tamaño medio de partículas ~ 9 µm), 40,0 %p de HA (pasivado mediante calentamiento como se describió anteriormente) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55 µm). Se mezclaron 18,5 g de la mezcla de polvo cerámico con 8 mL de disolución de iohexol (180 mg l/mL), es decir, una proporción líquido/polvo de 0,43 mL/g. La mezcla se llevó a cabo durante 30 segundos mediante el uso de un dispositivo de mezcla e inyección especialmente diseñado (documento WO 2005/122971). Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore.

10 Los resultados de la siguiente tabla muestran cómo variaron los tiempos de endurecimiento de un sustituto óseo basado en sulfato de calcio cuando se usó el mismo lote de HA, pero con diferentes tratamientos térmicos. El efecto retardante del polvo de HA sobre el tiempo de endurecimiento de CSH disminuye cuando se incrementa la temperatura, así como la duración del tratamiento térmico.

Temperatura	Tiempo	IST/min	FST/min
<i>Antes de la pasivación</i>		34,3 ± 1,0	61,3 ± 1,0
400 °C	1 h	17,1 ± 0,5	32,8 ± 1,0
400 °C	2 h	13,1 ± 0,3	24,4 ± 0,7
400 °C	3 h	10,2 ± 0,3	20,2 ± 0,3
500 °C	1 h	10,5 ± 0,8	21,0 ± 1,5
500 °C	2 h	10,1 ± 0,5	19,3 ± 0,6
600 °C	3 h	8,3 ± 0,4	17,0 ± 1,3

Ejemplo 8 - El efecto que la temperatura usada durante la pasivación podría tener sobre las propiedades de pH/tamponamiento.

- 20 Se trató térmicamente un polvo de HA bruto comercial, sinterizado (1275 °C durante 4 horas) y micronizado (distribución de tamaños de partículas: 0,1-20 µm, tamaño medio de partículas ~ 5 µm) a diferentes temperaturas (entre 120 - 900 °C durante 10 horas). Se identificó que el lote tuvo propiedades de tiempo de endurecimiento demasiado largo en un ensayo según el Ejemplo 1.

25 Después del tratamiento térmico, las diferentes muestras de pHA se evaluaron en el ensayo de pH/tamponamiento. Los diferentes lotes de HA también se mezclaron en mezclas de polvos cerámicos para evaluar su efecto sobre el endurecimiento del sulfato de calcio hemihidrato.

30 El ensayo de pH/tamponamiento demostró que el tratamiento térmico hasta 360° C no afectó al comportamiento del pH/tamponamiento para este lote ensayado, pero cuando la temperatura se incrementó hasta 900 °C (durante 10 h) tuvo efecto sobre el polvo. El polvo de HA que se había tratado térmicamente a 900 °C durante 10 h tuvo un incremento del pH y también una mayor capacidad de tamponamiento (había que añadir más ácido para disminuir el pH).

35 Una mezcla de un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 80 µm y tamaño medio de partículas ~ 9 µm), 40,0 %p de HA (preparado como se describió anteriormente) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55 µm) se mezclaron con una fase líquida que contenía iohexol (300 mg l/mL). Se mezclaron 3,0 g de la mezcla de polvo cerámico con 1,5 mL de disolución de iohexol (es decir, una proporción líquido/polvo de 0,5 mL/g). La mezcla de estas muestras pequeñas se llevó a cabo durante 60 segundos mediante el uso de una cuchara en un vaso de precipitados. Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore.

40 La siguiente tabla muestra cómo el pH y la capacidad de tamponamiento se vieron afectados por el tratamiento térmico del mismo lote de HA de 120 a 900 °C. Además, en la tabla también se muestra la variación del tiempo de endurecimiento de los sustitutos óseos de CSH/HA con un lote de HA tratado a las diferentes temperaturas. Los resultados demostraron que el efecto retardante que tiene el polvo de HA bruto sobre el tiempo de endurecimiento de sulfato de calcio disminuye cuando se incrementa la temperatura usada en la etapa de tratamiento térmico del HA bruto. Sin embargo, una temperatura demasiado elevada (y un tiempo demasiado largo) podría dar como resultado propiedades indeseables del HA con respecto a sus propiedades de pH/tamponamiento.

Temp. de pasivación	Duración de pasivación	pH	Cantidad de HCl 1 M necesaria para reducir el pH hasta 7,5	IST/min	FST/min
<i>Antes de la pasivación</i>	-----	10,5	200 µl	71	>71
120	10 h	10,7	200 µl	39	70
180	10 h	10,7	200 µl	29	74
360	10 h	10,5	200 µl	11	23
900	10 h	11,6	300 µl	11	25

Ejemplo 9 - Adiciones del antibiótico Cefazolina a sustitutos óseos basados en CSH/HA que contienen polvo de HA antes y después de la pasivación

Para evaluar el efecto del HA bruto en el comportamiento de endurecimiento de sustitutos óseos de CSH/HA, se prepararon dos tipos diferentes de sustitutos óseos. Ambos contuvieron el mismo tipo de polvo de HA bruto comercial, sinterizado (1275 °C durante 4 horas) y micronizado (distribución de tamaños de partículas: 0,1-40 µm, tamaño medio de partículas ~ 7 µm). El lote de HA se seleccionó después de un pre-ensayo inicial como se describió en el Ejemplo 1, ya que el sustituto óseo de CSH/HA resultante proporcionó resultados de endurecimiento aceptables. El polvo de HA se usó sin tratar (HA bruto) y después de haberlo sometido a tratamiento térmico a 500 °C durante 2 horas (es decir, pasivado). El objetivo de este estudio fue investigar si el efecto retardante que tiene el antibiótico cefazolina sobre el material de CSH/HA se podría disminuir si el HA bruto se hubiera pasivado antes de mezclarlo con cefazolina.

La mezcla de polvo cerámico consistió en un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 80 µm y tamaño medio de partículas ~ 9 µm), 40,0 %p de HA (bruto o pasivado como se describió anteriormente) y 0,4 %p del acelerador sulfato de calcio dihidrato (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55 µm). El polvo cerámico se mezcló con una fase líquida que contenía iohexol (180 mg l/mL) y 1 g de cefazolina (que correspondió a 5,4 %p de la fase de polvo cerámico). Se mezclaron 18,5 g de la mezcla de polvo cerámico con 8 mL de disolución de iohexol/cefazolina (es decir, una proporción líquido/polvo de 0,43 mL/g). La mezcla se llevó a cabo durante 30 segundos mediante el uso de un dispositivo de mezcla e inyección especialmente diseñado (documento WO 2005/122971). Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore.

La siguiente tabla muestra el efecto del antibiótico cefazolina en el mismo sistema de sustituto óseo dependiendo de si el HA se había pasivado o no. Los resultados demuestran que la pasivación del HA bruto tiene un gran impacto sobre el comportamiento de endurecimiento cuando está presente el antibiótico cefazolina. Sin pasivación, el tiempo de endurecimiento inicial fue cercano a una hora, pero disminuyó hasta < 10 minutos cuando el polvo de HA bruto se había pasivado a 500 °C durante 2 horas.

HA	IST/min	FST/min
<i>Antes de la pasivación</i>	53	61
Pasivado 500 °C, 1 h	7	11

Ejemplo 10 - El gran impacto que tiene la pasivación del HA bruto sobre el comportamiento de endurecimiento cuando se añade el antibiótico Gentamicina al sustituto óseo de CSH/HA.

En este estudio se evaluaron 9 lotes diferentes de HA bruto (A-I) del mismo productor. Todos los lotes se habían producido mediante sinterización a 1275 ± 50 °C durante 4 horas y después se habían micronizado. La distribución de tamaños de partículas y la superficie específica fueron similares para los 9 lotes de HA bruto (tamaño medio de partículas: ~ 5 µm y S.E.: ~ 1,5-2 m<sup>2</sup>/g). Los polvos de HA se usaron como HA bruto o después de haberlos tratado térmicamente a 500 °C durante 2 horas (es decir, pasivado). El objetivo de este estudio fue investigar si el efecto retardante que tiene el antibiótico gentamicina sobre el material de CSH/HA se podría disminuir si el HA se hubiera pasivado antes de mezclarlo con gentamicina.

La mezcla de polvo cerámico consistió en un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 40 µm y tamaño medio de partículas ~ 5 µm), 40,0 %p de hidroxiapatito (bruto o pasivado como se describió anteriormente) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55 µm). El polvo cerámico se mezcló con una fase líquida que consistió en sulfato de gentamicina disuelto en solución salina. Se mezclaron 6,3 g de la mezcla de polvo cerámico con 2,7 mL de disolución de solución salina/gentamicina (es decir, una proporción líquido/polvo de 0,43 mL/g). En cada muestra hubo 128 mg de sulfato de gentamicina (1,4 %p basado en la pasta y 2,0 %p basado en el polvo cerámico).



La mezcla de muestras pequeñas se llevó a cabo durante 30 segundos mediante el uso de una cuchara en un vaso de precipitados. Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore.

5 La siguiente tabla muestra los tiempos de endurecimiento para composiciones que contenían los mismos lotes y proporciones de sulfato de calcio, líquido y sulfato de gentamicina, pero diferentes lotes de HA antes y después de la pasivación a 500 °C durante 2 horas. Casi todas las composiciones proporcionaron tiempos de endurecimiento clínicamente irrelevantes cuando se usó HA sin pasivación, pero después de la pasivación, los tiempos de endurecimiento disminuyeron hasta valores relevantes, y solamente hubo pequeñas diferencias en los resultados, independientemente de qué lote de HA se hubiera usado. El ejemplo demuestra que sin pasivación solamente uno de 9 lotes de HA proporcionó propiedades de endurecimiento aceptables de este sistema específico con gentamicina añadida (criterios de aceptación de endurecimiento inicial  $\leq 15$  min), mientras después de la pasivación se pudieron usar las 9 muestras de HA. Los resultados demostraron que sin el uso de un HA pasivado la variabilidad del comportamiento de endurecimiento es grande entre las muestras de CSH/HA que contenían gentamicina, pero si en su lugar se usó un HA pasivado, los resultados fueron prácticamente idénticos, y todos con relevancia clínica.

Composiciones con Gentamicina y lote de HA:	Antes de la pasivación		Pasivado (500 °C, 2 h)	
	IST [min]	FST [min]	IST [min]	FST [min]
A	11,0 ± 0	15,0 ± 0	8,0 ± 0	11,0 ± 0
B	29,0 ± 1,7	>60	8,0 ± 0	11,5 ± 0
C	27,0 ± 0	>60	10,0 ± 2,6	19,0 ± 0
D	16,0 ± 0	27,0 ± 0	11,0 ± 0	15,0 ± 0
E	23,0 ± 3,5	>60	8,0 ± 0	10,3 ± 0,6
F	37,0 ± 0	>60	9,0 ± 0	15,0 ± 0
G	23,3 ± 2,3	49,0 ± 0	11,0 ± 0	15,0 ± 0
H	33,0 ± 0	>60	8,3 ± 0,6	12,0 ± 0
I	25,0 ± 1,7	>60	7,7 ± 0,6	12,0 ± 0

15 Ejemplo 11 - El gran impacto que tiene la pasivación del HA sobre el comportamiento de endurecimiento cuando se añade el antibiótico vancomicina al sustituto óseo de CSH/HA.

En este estudio se evaluaron 3 lotes diferentes de HA bruto (A-C) del mismo productor de HA. Todos los lotes se habían producido mediante sinterización a  $1275 \pm 50$  °C durante 4 horas y después se habían micronizado. La distribución de tamaños de partículas y la superficie específica fueron similares para los 3 lotes de HA bruto (tamaño medio de partículas:  $\sim 5$   $\mu\text{m}$  y S.E.:  $\sim 1,5\text{-}2$   $\text{m}^2/\text{g}$ ), pero ninguno de los lotes de HA bruto se pudieron usar en el sustituto óseo de CSH/HA si se usó una disolución de vancomicina e iohexol, debido a los tiempos de endurecimiento extremadamente largos ( $> 1$  hora). En este estudio se investigó si un tratamiento térmico a 500 °C durante 2 horas (es decir, pasivación) de los 3 lotes de HA bruto diferentes podría mejorar el proceso de endurecimiento del sustituto óseo cerámico cuando había presente vancomicina.

30 La mezcla de polvo cerámico consistió en un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 80  $\mu\text{m}$  y tamaño medio de partículas  $\sim 9$   $\mu\text{m}$ ), 40,0 %p de hidroxiapatito (bruto o pasivado como se describió anteriormente) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: distribución de tamaños de partículas: 0,1-55  $\mu\text{m}$ ). El polvo cerámico se mezcló con una fase líquida que consistió en disolución de iohexol (180 mg l/mL) con el antibiótico vancomicina predisoluto (500 mg de vancomicina que correspondió a 2,7 %p del peso del polvo).

Se mezclaron 18,5 g de la mezcla de polvo cerámico con 8 mL de disolución de iohexol/vancomicina (es decir, una proporción líquido/polvo de 0,43 mL/g). La mezcla se llevó a cabo durante 30 segundos mediante el uso de un dispositivo de mezcla e inyección especialmente diseñado (documento WO 2005/122971). Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore.

35 La siguiente tabla muestra los tiempos de endurecimiento para composiciones que contenían los mismos lotes y proporciones de CSH, CSD, líquido e hidrócloruro de vancomicina, pero diferentes lotes de HA antes y después de la pasivación a 500 °C durante 2 horas. Todas las composiciones proporcionaron tiempos de endurecimiento clínicamente irrelevantes cuando se usó el HA bruto *antes de la pasivación*, pero después de pasivación los tiempos de endurecimiento disminuyeron hasta valores relevantes. Los resultados demuestran que si se usa el HA sin tratamiento térmico (HA bruto), el endurecimiento se retrasa intensamente, mientras si el polvo de HA bruto se trata térmicamente, el endurecimiento de la pasta de CSH/HA es significativamente más corto.

Composiciones con Vancomicina y lote de HA:	Antes de la pasivación		Pasivado (500 °C, 2 h)	
	IST [min]	FST [min]	IST [min]	FST [min]
A	>60	>60	18,0 ± 0	31,0 ± 0
B	>60	>60	12,0 ± 0	23,3 ± 0,6
C	>60	>60	11,0 ± 0	18,0 ± 0

## Ejemplo 12 - Estabilidad de almacenamiento diferente del HA "bruto" y pasivado

Se investigó un polvo de HA bruto comercial, sinterizado (1275 °C durante 4 horas) y micronizado (distribución de tamaños de partículas: 0,1-40 µm, tamaño medio de partículas ~ 7 µm) en el estudio. El polvo se usó como HA bruto o después de un tratamiento térmico adicional a 500 °C durante 2 horas (es decir, pasivado). El lote de HA bruto se seleccionó después de un pre-ensayo inicial como se describió en el Ejemplo 1, ya que el sustituto óseo de CSH/HA resultante proporcionó resultados de endurecimiento aceptables. Los dos tipos de polvos de HA se colocaron en un medio húmedo (H.R. del 95-100%) a temperatura ambiente durante dos semanas para investigar la estabilidad hacia la humedad. Después se usaron en el sustituto óseo de CSH/HA, y se evaluó el comportamiento de endurecimiento de las diferentes pastas.

La mezcla de polvo cerámico consistió en un 59,6 %p de CSH producido sintéticamente (distribución de tamaños de partículas: 0,1 - 80 µm y tamaño medio de partículas ~ 9 µm), 40,0 %p de hidroxiapatito (bruto o pasivado como se describió anteriormente) y 0,4 %p del acelerador CSD (sintético: tamaño de partículas 0,1-55 µm). El polvo cerámico se mezcló con una fase líquida que consistió en una disolución de iohexol. Se mezclaron 11,6 g de la mezcla de polvo cerámico con 5 mL de disolución de iohexol (180 mg l/mL), es decir, una proporción líquido/polvo de 0,43 mL/g. La mezcla se llevó a cabo durante 30 segundos mediante el uso de un dispositivo de mezcla e inyección especialmente diseñado (documento WO 2005/122971). Se evaluó el comportamiento de endurecimiento de la pasta obtenida mediante el uso de agujas Gillmore.

La siguiente tabla muestra los tiempos de endurecimiento alcanzados para los sustitutos óseos endurecibles antes y después de haber almacenado el HA en el medio húmedo. Como se puede observar, el almacenamiento del HA bruto en un medio húmedo dio como resultado tiempos de endurecimiento más prolongados cuando se usó en el sustituto óseo de CSH/HA endurecible que cuando se almacenó y usó el HA pasivado. Si el HA no se pasivó, se retrasó el endurecimiento de la pasta de CS/HA. Estos resultados indican que el HA pasivado es más resistente en el almacenamiento.

HA	Tiempos de endurecimiento antes del almacenamiento		Tiempos de endurecimiento después del almacenamiento	
	IST/min	FST/min	IST/min	FST/min
"HA bruto"	8,5	19,5	26,0	41,3
HA pasivado	6,5	12,0	9,0	16,0

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un polvo de hidroxiapatito cristalino sinterizado pasivado (pHA) que incluye las etapas de:
  - 5 a) proporcionar un polvo de hidroxiapatito cristalino sinterizado (HA bruto) con la fórmula química  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ ,
  - b) calentar el polvo de HA bruto a una temperatura entre 300 y 900 °C durante entre 10 minutos y 10 horas para obtener un polvo de hidroxiapatito cristalino sinterizado pasivado (pHA).
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el polvo de hidroxiapatito cristalino sinterizado (HA bruto) se calienta a una temperatura entre 300 y 600 °C durante 1 a 4 horas.
- 10 3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que el polvo de hidroxiapatito cristalino sinterizado (HA bruto) se produce:
  - 1) sinterizando hidroxiapatito a una temperatura por encima de 900 °C, y
  - 2) micronizando el hidroxiapatito sinterizado (HA) para obtener dicho polvo de HA bruto con un tamaño de partícula por debajo de 200  $\mu m$  (D(v,0,99)) y una superficie específica por debajo de 20  $m^2/g$  (BET).
- 15 4. Un método para preparar un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso que comprende un polvo de sulfato de calcio como componente de endurecimiento y un polvo de hidroxiapatito cristalino, que incluye las etapas de:
  - a) proporcionar un polvo de hidroxiapatito cristalino sinterizado pasivado (pHA) obtenido en un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
  - 20 b) proporcionar un polvo de sulfato de calcio, y
  - c) mezclar los dos polvos en una proporción adecuada.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que el polvo de sulfato de calcio es polvo de sulfato de calcio hemihidrato.
- 25 6. Un método según la reivindicación 4 o 5, en el que el polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso comprende además un acelerador para el endurecimiento de sulfato de calcio seleccionado de sulfato de calcio dihidrato y una sal adecuada de cloruro o sulfato, tal como cloruro sódico.
7. Un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso que comprende un polvo de sulfato de calcio como componente de endurecimiento y un polvo de hidroxiapatito cristalino pasivado (pHA) preparado mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 4-6.
- 30 8. Un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso según la reivindicación 7, que comprende un 35-45 %p de polvo de hidroxiapatito sinterizado pasivado (pHA), un 55-65 %p de polvo de sulfato de calcio hemihidrato y hasta un 5 %p de un acelerador para el endurecimiento de sulfato de calcio, del peso total de los componentes del polvo.
9. Un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso según la reivindicación 7 o 8 que consiste en:
  - a) un 35-45 %p de polvo de hidroxiapatito sinterizado pasivado (pHA);
  - 35 b) un 55-65 %p de polvo de sulfato de calcio hemihidrato;
  - c) un 0-5 %p de polvo de sulfato de calcio dihidrato; y d) un 0-10 %p de otros componentes.
10. Un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 que comprende uno o más agente(s) bioactivo(s) seleccionado(s) del grupo que consiste en antibióticos, que incluyen fármacos antifúngicos, agentes quimioterápicos, vitaminas, hormonas, agentes citostáticos, bisfosfonatos, factores de crecimiento, promotores de la cicatrización ósea, proteínas, péptidos, aspirado de médula ósea, plasma rico en plaquetas y hueso desmineralizado;
 

en el que el agente antibiótico pertenece al grupo de antibióticos aminoglicósidos, el grupo de penicilina, el grupo de cefalosporina, el grupo de fármacos antifúngicos, rifampicina o clindamicina.
- 40 11. Un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso según la reivindicación 10, en el que el agente antibiótico se selecciona del grupo que comprende gentamicina, vancomicina, tobramicina, cefazolina, rifampicina, clindamicina, y el fármaco antifúngico se selecciona del grupo que comprende nistatina, griseofulvina, anfotericina B, cetoconazol y miconazol.
- 45

12. Una pasta de sustituto óseo endurecible que comprende un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-11 mezclado con un líquido acuoso.
13. Una pasta de sustituto óseo endurecible según la reivindicación 12, en la que el líquido acuoso es agua o agua que comprende una sal de cloruro o sulfato y/o un agente de contraste de rayos X no iónico hidrosoluble.
- 5 14. Una pasta de sustituto óseo endurecible según la reivindicación 13, en la que el agente de contraste de rayos X no iónico hidrosoluble se selecciona de iohexol, iodixanol, ioversol, iopamidol, iotrolano, metrizamida, iodecicol, iogluco, iogluca, iogluca, iogluca, iomeprol, iopentol, iopromida, iosarcol, iosimida, iotusal, ioxilano, iofrotal, e iodecol.
- 10 15. Una pasta de sustituto óseo endurecible según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en la que la proporción líquido/polvo (L/P) está en el intervalo de 0,2 a 0,6 ml/g.
16. Una pasta de sustituto óseo endurecible según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en la que la pasta es inyectable.
- 15 17. Una pasta de sustituto óseo endurecible según cualquiera de las reivindicaciones 12-15 para el uso en el tratamiento de un trastorno de los tejidos de sostén en un sujeto humano o no humano mediante la regeneración del tejido óseo perdido y/o el tratamiento de las infecciones óseas.
18. Una pasta de sustituto óseo endurecible según la reivindicación 17, en la que el trastorno se selecciona de afecciones que comprenden osteopenia, fractura ósea, traumatismo óseo y osteomielitis.
- 20 19. Un kit para preparar una pasta de sustituto óseo endurecible inyectable según cualquiera de las reivindicaciones 12-18, que comprende un polvo de sustituto óseo endurecible listo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-11.
20. Un kit según la reivindicación 19, que comprende además uno o más agente(s) bioactivo(s) tal(es) como antibióticos, fármacos antifúngicos, agentes quimioterápicos, vitaminas, hormonas, agentes citostáticos, bisfosfonatos, factores de crecimiento, promotores de la cicatrización ósea, proteínas, péptidos, aspirado de médula ósea, plasma rico en plaquetas y/o hueso desmineralizado en uno o más recipientes diferentes.
- 25 21. Un kit según la reivindicación 19 o 20, que comprende además un líquido acuoso adecuado en un recipiente diferente, y el líquido contiene o no un agente de contraste de rayos X no iónico.
22. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 19-21, que comprende además un dispositivo combinado de mezcla e inyección y/o instrucciones.

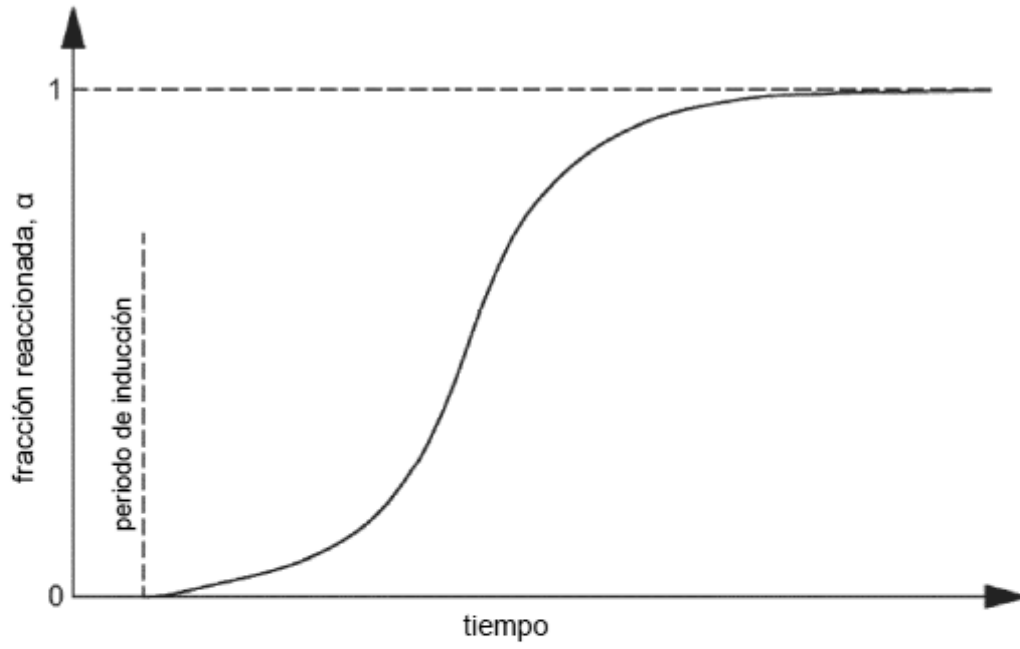


FIGURA 1

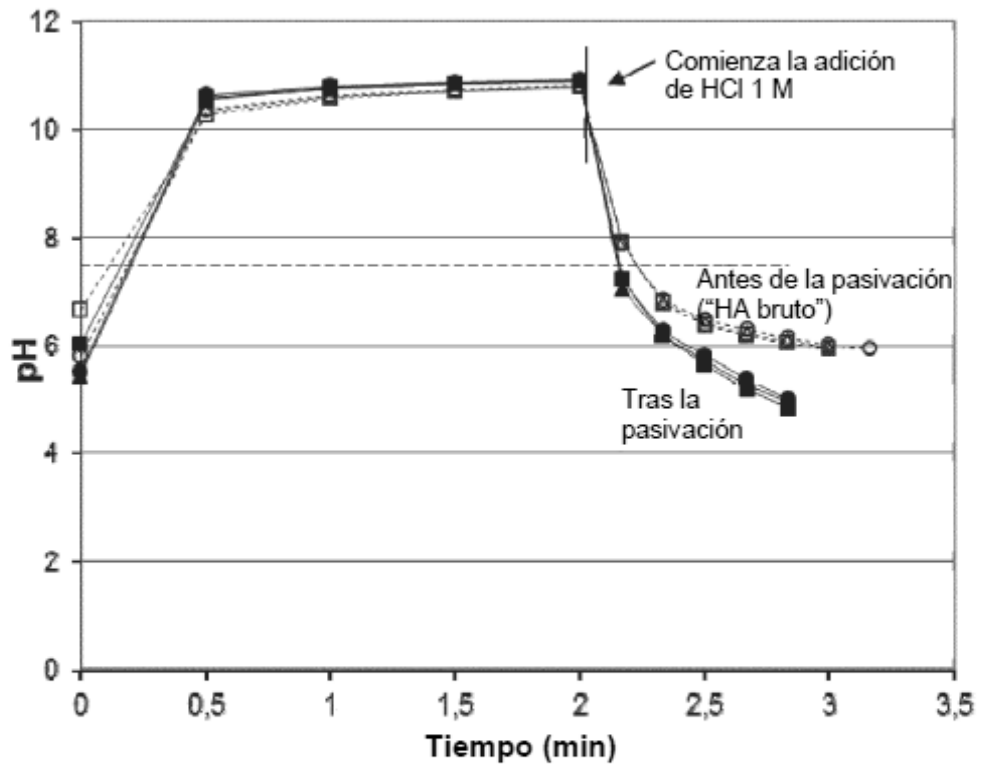


FIGURA 2

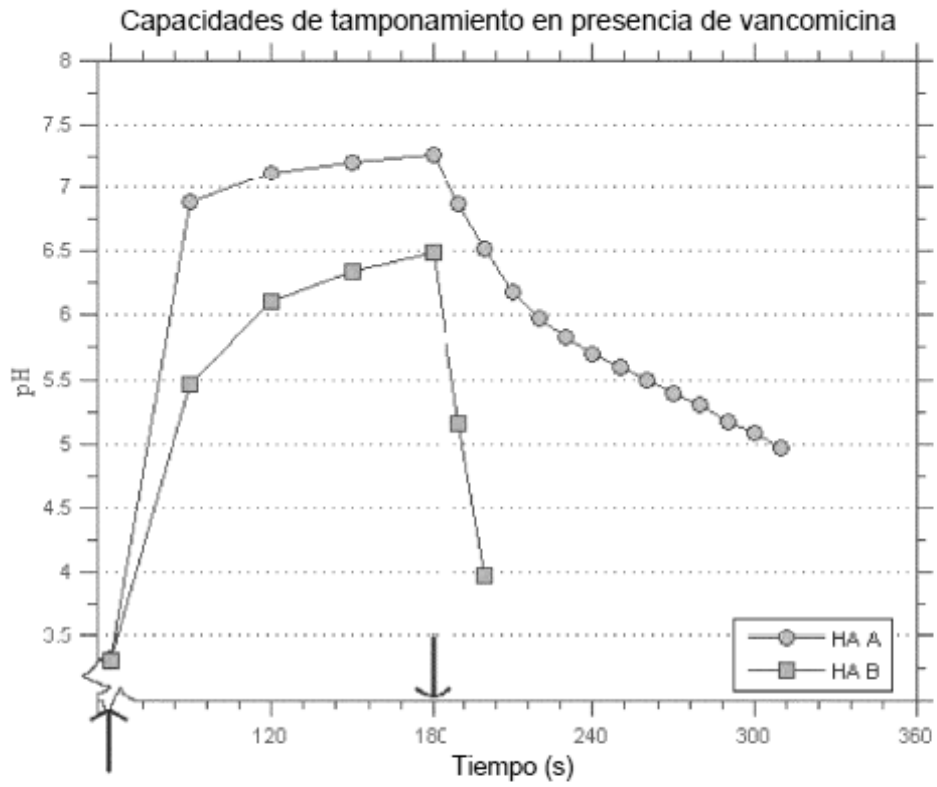


FIGURA 3



FIGURA 4