

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 324**

51 Int. Cl.:

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61L 27/46** (2006.01)

**A61L 24/00** (2006.01)

**A61L 24/08** (2006.01)

**C08L 5/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2013 PCT/IS2013/050003**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13160917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2013 E 13724891 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2841114**

54 Título: **Composiciones de cemento bioactivo autoendurecible con quitina parcialmente desacetilada como sustituyentes de los injertos óseos**

30 Prioridad:  
**23.04.2012 IS 50032**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.10.2018**

73 Titular/es:  
**GENÍS HF. (100.0%)  
Adalgata 34  
580 Siglufjördur, IS**

72 Inventor/es:  
**GISLASON, JOHANNES;  
EINARSSON, JON M. y  
NG, CHUEN HOW**

74 Agente/Representante:  
**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 688 324 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de cemento bioactivo autoendurecible con quitina parcialmente desacetilada como sustituyentes de los injertos óseos

5

**Campo de la invención**

La invención está dentro del campo del tratamiento médico de las fracturas óseas y los defectos óseos, y se refiere a compuestos y composiciones de quitina parcialmente desacetilada, y a su uso médico.

10

**Antecedentes técnicos y técnica anterior**

Cuando una enfermedad o un traumatismo provocan un hueco esquelético, o siempre que se vea afectada la curación de una fractura, una técnica quirúrgica común implica la extracción de hueso de la cresta ilíaca y la transferencia del injerto óseo al sitio de la lesión. Esto se conoce como autoinjerto óseo. El autoinjerto se usa para rellenar el hueco óseo, proporcionando las propiedades osteoconductoras y osteogénicas necesarias para la curación eficaz de la lesión. Esta tecnología, en general, es considerada la regla de oro de la cirugía ortopédica, pero tiene graves inconvenientes debido a la morbilidad frecuente asociada con la extracción del hueso. Por lo tanto, la industria y la academia han deseado sustituyentes de los injertos óseos que poseen propiedades osteoconductoras y osteogénicas con el objetivo de eliminar la necesidad de los autoinjertos óseos. Dichos sustituyentes de los injertos óseos se denominan, en general, sustituyentes de injertos óseos sintéticos. Hasta la fecha, no ha aparecido un solo producto que demuestre aportar propiedades osteoconductoras y osteogénicas a una lesión con sustanciales deficiencias óseas.

15

20

25

30

La quitina es un biopolímero natural que se puede obtener de la cáscara de los crustáceos, pero también se puede obtener de otros invertebrados y de hongos. Mediante la desacetilación de los restos de *N*-acetilglucosamina del polímero de quitina, normalmente hidrolizando los enlaces de *N*-acetilo con álcali concentrado, se obtiene quitosano. Por definición, el quitosano, en general, se describe como un copolímero de *D*-glucosamina (*D*) y *N*-acetil-*D*-glucosamina (*A*), que es insoluble en agua a pH superior a 6,2 - el punto isoelectrico del grupo amino libre - pero se disuelve a pH inferior a aproximadamente 6,2. Por lo general, aproximadamente el 75-100 % de las unidades monoméricas del copolímero de quitosano convencional son *D*-glucosamina, lo que se puede describir como el 75-100 % de quitosano desacetilado o que tiene un grado de desacetilación (GD) del 75-100 %. Por consiguiente, el 0-25 % de los monómeros de dicho material son grupos *N*-acetil-*D*-glucosamina (*A*).

35

Cuando el grado de desacetilación es inferior al aproximadamente 75 %, el polímero de quitina muestra diferentes propiedades de solubilidad, y dicho material, con un GD del aproximadamente 75 % al aproximadamente 40 %, se refiere, en general, a quitina parcialmente desacetilada, denominada en el presente documento QPD.

40

Los presentes inventores han descrito previamente las propiedades biológicas del polímero y de los oligómeros de quitina parcialmente desacetilada. El documento WO 03/026677 describe el uso de oligómeros de QPD para tratar las afecciones reumatoideas.

45

Chae Cho *et al.* (*J. Craniofacial Surgery* Vol. 16 n.º 2, marzo de 2005) describen experimentos con microgránulos sólidos con compuestos de sulfato de quitosano y calcio, y sus efectos sobre la osteogénesis de la tibia defectuosa en conejos, usando quitosano con un GD del 90 %.

50

Yamada *et al.* (*J. Biomed. Mat Research* Vol. 66A n.º 3, 1 de septiembre de 2003, pág. 500-506) investigan y analizan los efectos del quitosano sobre la mineralización biológica y los efectos investigados del quitosano complementado en medio de cultivo sobre los osteoblastos.

Klokkevold *et al.* (*J Periodontol.* noviembre de 1996; 67 (11): 1170-75) evaluaron el efecto del quitosano en la diferenciación de las células osteoprogenitoras.

55

El documento WO 2004/028578 desvela una composición para estimular la formación ósea y la consolidación ósea que comprende proteína morfogénica ósea (BMP) como principio activo en una formulación con soluciones de tripolifosfato y quitosano, en la que las dos soluciones se solidificarán instantáneamente al mezclarse, causando problemas específicos de manejo en el entorno clínico.

60

El documento WO 01/41822 describe formulaciones híbridas de mineral-polímero autogelificantes que comprenden (i) un componente líquido termogelificante a base de agua que comprende quitosano disuelto y tiene un pH de entre 6,5 y 7,4; e (ii) un componente sólido que comprende calcio, dichos componentes líquido y sólido se mezclarán entre sí para formar una composición termogelificante no endurecible, que formará un gel a la temperatura corporal.

65

El documento WO 2006/134614 analiza las propiedades biológicas del polímero y oligómero de quitina parcialmente desacetilada, y analiza cómo dichos oligómeros actúan como bloqueantes para las enzimas quitinasas. El documento desvela además un material compuesto de autofraguado que tiene una proporción de sólido:líquido de

1:0,55 (Tabla 1, página 26). Se informa de un tiempo de fraguado del material compuesto de 5 min y 44 s.

El documento WO 2006/057011 desvela implantes sólidos de hidroxiapatita y quitosano coprecipitados en una proporción de 1:1 (el quitosano tiene un grado de desacetilación del 87 %), y composiciones con consistencia de tipo "masilla", que contienen un total del 5 % de quitosano, fosfato de calcio y polidimetilsiloxano, y una proporción del sólido con respecto al líquido de 2:1. La pasta se probó para la curación de lesiones óseas inducidas en ratas.

En general, en la técnica, se sostiene que el quitosano en sí no es osteoconductor (véase, por ejemplo Venkatesan y Kim, "Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering - An Overview", *Mar Drugs* 2010; 8(8): 2252-2266).

Un mayor desarrollo de productos alternativos y más eficaces, que sean prácticos para aplicaciones clínicas, sigue siendo muy apreciado para los tratamientos de curación ósea eficaces y de bajo coste.

### Sumario de la invención

Los presentes inventores han estudiado detenidamente los efectos biológicos de los polímeros y oligómeros de quitina parcialmente desacetilada (QPD), y han desarrollado composiciones de cemento óseo novedosas y eficaces que estimulan la regeneración de nuevo tejido óseo. La invención proporciona material de cemento óseo bioactivo autoendurecible *in situ* inyectable. Las composiciones de la invención son útiles como sustituyentes de los injertos óseos artificiales.

Las composiciones tienen varias ventajas prácticas, tales como:

- ingredientes naturales y no tóxicos, sin humos ni olores durante la mezcla;
- buena biocompatibilidad y exentas de reacción hacia el cuerpo extraño por el tejido del hospedador;
- baja generación de calor durante el curado;
- permite la inyección y el relleno de huecos sin ninguna fuga significativa;
- buena moldeabilidad e inyectabilidad que permite la aplicación con técnicas mínimamente invasivas (inyección);
- cohesión y buenas propiedades de campo en húmedo, permitiendo la inyección en un ambiente húmedo sin excesiva disolución ni pérdida de la integridad;
- tiempo de trabajo adecuado, permitiendo un tiempo de aplicación apropiado, con un curado relativamente rápido *in situ*;
- pH y salinidad casi fisiológicos tras la curación *in situ*;
- buena capacidad de carga, permite la mezcla de componentes líquidos como la sangre, o componentes sanguíneos, médula ósea o solución de aislados proteicos, etc.;
- previene la formación de tejido cicatricial en el tejido óseo del hospedador lesionado y potencia la regeneración del nuevo tejido óseo en la superficie y dentro de la composición de relleno de huecos;
- posee propiedades antimicrobianas beneficiosas y, por lo tanto, ayuda a minimizar el riesgo de infección.

Las nuevas composiciones de la presente invención se basan en propiedades de la QPD que dependen del grado de desacetilación y del peso molecular, y usa QPD con un grado de desacetilación en el intervalo de 40-75 %. Se pueden optimizar adecuadamente otros parámetros como se describe más detalladamente en el presente documento.

Los presentes cementos óseos se proporcionan como kits con una fracción sólida que comprende QPD y una fracción líquida, que deben mezclarse antes de su uso. Las composiciones mezcladas contienen una baja proporción del sólido con respecto al líquido, en el intervalo de 1:2 a 1:3.

La invención proporciona además métodos para la curación de los defectos óseos y de afecciones tales como las fracturas óseas.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ilustración de la configuración para medir la cohesión/segregación. (1) nivel del agua; (2) composición de cemento; (3) red de malla.

Figura 2: Medición de la resistencia a la inyección de las composiciones con diferente grado de desacetilación (GD), véase el Ejemplo 2.

Figura 3: Resistencia a la compresión de las composiciones de cemento de la invención, con diferente grado de desacetilación y diferente cantidad de QPD.

Figura 4: Estandarización del volumen mandibular para análisis de micro TC (véase el Ejemplo 3). Orientación del cilindro mayor (CM) que abarca toda la parte posterior de la mandíbula y el cilindro pequeño (CP) que abarca la composición implantada.

Figura 5: Volumen total formado a lo largo de la superficie de la mandíbula de la rata 7 días después de la implantación en comparación con el volumen total en el día 0 (d0 GD 70). Media y ETM de 7-8 individuos (Ejemplo 3).

5 Figura 6: Sección transversal a través de la mandíbula de una rata injertada con un material compuesto polimérico de GD del 70 %, 14 días después de la operación. La sección es 1-2 mm frontal al orificio perforado. La figura superior muestra una sección de parafina teñida con H & E de la mandíbula. La figura inferior presenta una sección transversal de una construcción de micro TC a través de la misma región de la misma mandíbula (véase el Ejemplo 3).

10 Figura 7: Construcción de micro TC de un orificio vacío de una tibia de la pata izquierda de una oveja receptora de una composición de la presente invención en la tibia de la pata derecha. La figura representa secciones transversales en tres planos diferentes (x, y y z) tras 3 meses de la operación (véase el Ejemplo 4).

15 Figura 8: Construcciones de micro TC de la tibia de la pata derecha receptora de la composición de la presente invención en tres planos diferentes (x, y y z) 3 meses después de la operación *in vivo*. Se puede observar tejido denso mineralizado a lo largo de la superficie de la composición junto con islas dispersas de tejido mineralizado en todo el interior de la composición implantada.

20 Figura 9: Mineralización (por mm<sup>3</sup>) dentro de una esfera virtual creada con un radio de 2 mm dentro de una composición implantada de la presente invención. (Véase el Ejemplo 4).

25 Figura 10: Mineralización ósea (por mm<sup>3</sup>) en el cilindro virtual R3 y en los depósitos virtuales R4-R3, R5-R4 y R6-R5.

Figura 11: Imagen microscópica de la composición implantada de la presente invención que muestra nuevas formaciones de hueso dentro de la composición implantada (véase el Ejemplo 4).

### Descripción detallada

30 La presente invención proporciona kits fáciles de usar adecuados para la cirugía ósea, que comprenden fracciones sólidas y líquidas que están envasadas por separado y esterilizadas por irradiación gamma. Justo antes de la operación, la fracción líquida se mezcla con la fracción sólida para producir cemento líquido o pastoso. La mezcla de cemento se puede inyectar convenientemente en huecos o fracturas óseas, y posee buena moldeabilidad y buena cohesión. También permite la aplicación en el hueso usando técnicas mínimamente invasivas, tales como inyecciones a través de una aguja. En otras realizaciones, la composición se aplica sobre una superficie ósea existente, por ejemplo, con una espátula o un instrumento similar.

40 Como se explica en el presente documento, las presentes composiciones están optimizadas tanto para proporcionar soporte mecánico a los defectos óseos como para mejorar la regeneración de nuevo tejido óseo estimulando a las células osteogénicas a que residan y proliferen en la superficie y en el interior del material compuesto implantado. Esto se obtiene creando condiciones fisiológicas deseables, tales como en términos de pH y salinidad, y facilitando la penetración celular y la biodegradabilidad/reabsorción del material compuesto mediante el control de la proporción de sólido-líquido. La presente invención está optimizada para controlar las propiedades fisicoquímicas y biológicas del material compuesto implantado. Esto puede implicar uno o más de los siguientes: controlar el pH a través de la capacidad de tamponamiento del ácido de la composición (que es preferentemente ácido fosfórico) y quitina parcialmente desacetilada; controlar la fuerza iónica mediante selección cuidadosa de electrolitos y controlar la capacidad de unión del agua/las propiedades de campo en húmedo y la fuerza de inyección mediante el ajuste apropiado del grado de acetilación del polímero de QPD y la cantidad relativa de QPD en la composición. El estímulo biológico de las células osteogénicas se obtiene a través de la hidrólisis *in situ* de la QPD por parte de las 18 quitinasas de la familia endógena que son expresadas por diversas células del sistema inmune. Esto es respaldado por los datos de los presentes inventores mostrados y analizados más detalladamente en el Ejemplo 3 (Véase el Ejemplo 3 "Resultados"). Esto generará una liberación sostenida de especies moleculares biológicamente activas de oligosacáridos de QPD. Por lo tanto, estas moléculas oligoméricas se liberarán gradualmente a medida que se degrade el material compuesto, y se difundirán en los tejidos adyacentes proporcionando un estímulo sostenido a las células osteogénicas para que invadan el material compuesto en degeneración que, a su vez, será reemplazado por nuevo tejido óseo. Para la optimización de todo este proceso, la proporción del sólido con respecto al líquido desempeña un papel clave.

60 Por consiguiente, para optimizar las propiedades anteriores, se ha encontrado que, sorprendentemente, es ventajoso que las composiciones mezcladas contengan una proporción baja de fracción sólida con respecto a la fracción líquida, en el intervalo de 1:2 a 1:3, incluyendo, pero sin limitación, proporciones de 1:2, 1:2,25, 1:2,5 y 1:3. (Estas proporciones corresponden a un contenido en peso de la fracción sólida en la mezcla combinada del 33,3 %, 30,8 %, 28,6 % y 25 %).

65

Las composiciones de cemento con la proporción preferida del sólido con respecto al líquido (S/L) tienen buena cohesión (muestran poca segregación) en el cuerpo humano y buenas propiedades de campo en húmedo con disolución mínima, lo que significa que el material mantiene su integridad y no se extiende desde el sitio de la inyección. Esto permite una buena capacidad de relleno de cavidades, incluyendo la infiltración en el hueso esponjoso y poroso, combinada con una adhesión inicial y prolongada al tejido óseo. Si bien una baja proporción de S/L puede dar lugar a una resistencia mecánica reducida del cemento, la proporción de S/L optimizada y el contenido de quitosano facilitan una degradación más rápida del cemento, lo que permite una penetración más eficaz de las células en el material compuesto y que haya QPD e hidroxiapatita osteogénicas disponibles para el inicio precoz de la regeneración ósea. Por lo tanto, la baja resistencia mecánica inicial se compensa con el comienzo precoz de la osteogénesis y la posterior acumulación de hueso nuevo, aceptando rápidamente la carga mecánica.

La resistencia mecánica se puede evaluar de una serie de maneras, algunas de las cuales se describen en el Ejemplo 1 adjunto. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención tienen una resistencia mecánica medida como resistencia a la compresión final, tras el fraguado durante 24 h a 37 °C en solución salina (NaCl al 0,9%), en el intervalo de 0,2 a 10°N/mm<sup>2</sup>, tal como en el intervalo de 0,5-5°N/mm<sup>2</sup> o en el intervalo de 0,5-2,5°N.

Como resultado de la baja proporción de S/L deseada de las composiciones, los materiales compuestos de cemento curados de la invención tendrán un contenido sustancial de agua libre, lo que indica la naturaleza abierta, porosa del implante de material compuesto formado. Por consiguiente, las composiciones de la invención tienen, en realizaciones preferidas, un contenido de agua libre tras el curado (agua liberada por secado a 105°C durante 24 h) en el intervalo de aproximadamente 40-90%, o más preferentemente en el intervalo de 40-70% en peso, tal como en el intervalo de 50-70% en peso, tal como en el intervalo de aproximadamente 55-65% en peso, y más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 60-65% en peso, tal como aproximadamente 60% en peso. Estos valores se refieren al contenido medido de agua libre en cemento formado *in vitro*, curado durante 24 horas en solución salina (NaCl al 0,9%). En general, cuanto menor es la proporción de S/L, mayor es la pérdida de agua durante el secado del material compuesto curado. Como ejemplo, una proporción de S/L de 2 puede dar lugar a una pérdida de agua de aproximadamente 60-65% del peso húmedo curado.

La cohesión/disolución o pérdida de integridad se puede evaluar de diversas maneras. Los inventores han encontrado útil evaluar esta propiedad colocando una cantidad de composición recién mezclada sobre una malla (por ejemplo, malla de aproximadamente 1 mm) bajo la superficie del líquido en un vaso de precipitados con solución salina, en el que se agita la solución con una barra magnética. (Véase la descripción más detallada en el Ejemplo 1). Preferentemente, después de un breve período de agitación, tal como durante 10 minutos, todavía está adherido sustancialmente todo el material, tal como más del 95%, o más preferentemente, más del 98% y aún más preferentemente, más del 99%, y más preferentemente, más del 99,9%.

La composición de cemento mezclada tiene preferentemente un pH cercano a la neutralidad, o en el intervalo de aproximadamente 6,0 a 7,8, y más preferentemente, en el intervalo de 6,5 a 7,4, lo más preferentemente aproximadamente pH 7. La fracción sólida que contiene fosfato de calcio, en general, será esencialmente alcalina, mientras que la fracción líquida normalmente será ácida con el fin de neutralizar los fosfatos alcalinos. En realizaciones preferidas, la fracción líquida comprende uno o más ácidos seleccionados entre, pero sin limitación, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido málico y ácido glutámico. La concentración/cantidad de ácido adecuada suficiente para neutralizar la composición mixta depende de la proporción de S/L de la composición, de la cantidad de fosfatos, así como del GD de la QPD. Con una proporción de S/L más baja (menos sólidos), se necesita menos cantidad de ácido. El ácido preferido en las presentes realizaciones es ácido fosfórico. En realizaciones preferidas, el componente líquido comprende al menos aproximadamente el 5% de ácido fosfórico, tal como en el intervalo de aproximadamente 2,5-20% en peso de ácido fosfórico, tal como en el intervalo de 2,5-15% en peso o en el intervalo de 5-15%, tal como aproximadamente 5%, aproximadamente 8%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12% o aproximadamente 15%. En otras realizaciones útiles, la fracción líquida comprende uno o más ácidos distintos, como alternativa o además del ácido fosfórico, tal como uno o más de los ácidos mencionados anteriormente. En estas realizaciones, la cantidad total de ácido debe ser preferentemente suficiente para neutralizar esencialmente la solución tras mezclar la fracción sólida alcalina con la fracción líquida. Por consiguiente, se prefiere que la acidez sea al menos la misma que para una solución de ácido fosfórico al 5%. Por consiguiente, la fracción líquida puede tener adecuadamente un pH en el intervalo de aproximadamente 1 a 2,5, y más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 a 2. En otras realizaciones, la acidez puede alcanzarse proporcionando una cantidad de ácido en la fracción líquida que tenga una normalidad equivalente (N) a una solución de ácido fosfórico al 5%, o una mayor concentración del ácido, tal como se ha mencionado anteriormente.

La propia QPD también tiene capacidad de tamponamiento, por tanto, los materiales compuestos autoendurecibles de fosfato de calcio convencionales muestran una caída del pH más rápida y menos controlable durante el curado en comparación con las composiciones preferidas de la presente invención. La presencia de QPD significa que la QPD puede consumir (neutralizar) los protones residuales durante la formación de hidroxiapatita y, de ese modo, reducir el cambio de pH.

Se deduce que si se usan otros ácidos además de o en lugar del ácido fosfórico, se puede requerir más fosfato de calcio para proporcionar suficiente contenido de fosfato. En la composición global, tras mezclar la fracción sólida y líquida, el contenido de ácido de la composición así obtenida es preferentemente de al menos aproximadamente el 2,0% de ácido fosfórico, o un equivalente de otro/s ácido/s con o sin ácido fosfórico, tal como en el intervalo de aproximadamente 2,5-25%, tal como aproximadamente 3,5-15% o en el intervalo de 5-10% de ácido fosfórico o una equivalencia del mismo.

Las composiciones de la presente invención tienen buena inyectabilidad. La fuerza de inyección óptima para inyectar 2-3 ml de la composición de cemento recién preparada de la invención, con una jeringa de 5 ml (B. Braun o equivalente) con un DI de 12 mm y una salida de 2 mm, está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10-30 N, y más preferentemente no es superior a aproximadamente 20 N, siendo más preferentemente inferior a aproximadamente 15 N o inferior a aproximadamente 10 N. Esto se puede medir como se describe en el Ejemplo 1.

Las composiciones de la invención comprenden QPD incorporada en la fracción sólida; esto tiene un papel decisivo en el fraguado del cemento. Cuanto mayor sea el grado de desacetilación (GD), menor es el tiempo de fraguado. Por otro lado, el fraguado está vinculado a la temperatura, es decir, cuanto mayor es la temperatura, más rápido es el tiempo de fraguado. Por lo tanto, el tiempo de fraguado del cemento puede regularse seleccionando la QPD con parámetros adecuados, y optimizando así la composición de acuerdo con las necesidades reales de operación. A temperatura ambiente (20-25 °C) con QPD de GD del 50 %, el tiempo de fraguado alcanzado es de 30 minutos, mientras que a < 5 °C, el tiempo de fraguado puede extenderse a > 3 horas.

En el presente documento, la expresión "tiempo de fraguado" se refiere al punto de tiempo a partir de la mezcla, cuando el cemento se ha endurecido en la medida en que no se puede aplicar fácilmente como se describe en el presente documento y ya no puede moldearse sin que se rompa.

Otra expresión útil es el tiempo de trabajo o tiempo de uso, que se refiere al tiempo en el que la composición se puede trabajar/usar, tras la mezcla inicial (y breve espera para que la composición se vuelva lo suficientemente uniforme) y hasta que se alcanza el tiempo de fraguado. Para las composiciones de la presente invención, el tiempo de uso a temperatura ambiente (20-25 °C) está preferentemente entre 2 y 25 minutos desde la mezcla inicial, tal como 2-20 minutos o 3-20 minutos desde la mezcla. Este puede variar según la composición y la temperatura exactas en la sala de operaciones. En general, para una composición de proporción de S/L inferior, el período de espera para que se inicie el tiempo de trabajo es más largo, como en el intervalo de 3-8 minutos para la proporción de S/L en el intervalo de 1:2 a 1:3, pero esto se compensa con un tiempo de fraguado posterior. Por consiguiente, cuando la proporción de S/L es de 1:2, el tiempo de trabajo es de aproximadamente 6 minutos desde la mezcla, durando aproximadamente 20 minutos desde la mezcla, dando así un mayor tiempo de uso. Con valores de S/L aún más bajos (como de 1:2,5 o 1:3) el tiempo de trabajo se desplaza aún más, comenzando incluso más tarde después de la mezcla, pero la composición permanece operativa durante más tiempo.

La resistencia mecánica deseada normalmente se alcanza ajustando la cantidad relativa de QPD, que es crucial para las propiedades mecánicas del cemento. El cemento alcanza la resistencia máxima a la compresión al aproximadamente 20 % de QPD, p/p, del cemento total. En general, es posible preparar cemento con un 50 % de QPD, p/p. Las composiciones de la presente invención comprenden, en realizaciones preferidas, una cantidad de QPD que es un 10 % en peso o inferior del peso total de la composición combinada (fracciones sólida y líquida), tal como en el intervalo de aproximadamente 2-10 % de las fracciones combinadas, y en algunas realizaciones, en el intervalo de aproximadamente 2,5-5 %.

Además, la cantidad de QPD en las composiciones de cemento tiene un efecto sobre el efecto osteogénico cuando se aplica en un hueso óseo o en una fractura ósea, produciendo una cantidad superior un mayor efecto osteogénico.

Para las composiciones de la invención, la fracción de sólidos comprende preferentemente QPD en el intervalo de 3-30 % en peso; el cemento con más de dicha cantidad de QPD puede inducir un crecimiento óseo excesivo, dependiendo del grado y del patrón de acetilación. Más preferentemente, la fracción de sólidos comprende QPD en el intervalo de 5-15 % en peso, tal como en el intervalo de 5-10 %.

Se prefiere que la QPD de las composiciones de la invención comprenda polímero regenerado, que haya sido sometido a disolución y a la posterior filtración de las impurezas, y para eliminar las endotoxinas de la matriz y, tras ello, al secado en un proceso de secado adecuado. Este quitosano regenerado puede reemplazarse, en otras realizaciones, por quitosano clásico o quitina parcialmente desacetilada con un grado de desacetilación, un peso molecular y un tamaño de partícula similares, con la condición de que sea esencialmente puro y contenga niveles bajos de endotoxinas. Además, se puede usar la forma de sal u otra forma de QPD o quitosano químicamente modificado, tal como quitosano cuaternario, carboximetilquitosano, etc., para la formulación de cemento en ciertas realizaciones de la invención. La QPD de las composiciones de la invención es preferentemente QPD altamente purificada con niveles de endotoxinas inferiores a 100 UE/g. Esto garantiza una buena biocompatibilidad del cemento y proporciona efectos osteogénicos instantáneos cuando entra en contacto con el tejido óseo.

Como se ha mencionado, el material de QPD usado en la invención tiene un grado de desacetilación en el intervalo de 40-75 %, y más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 40-70 %, tal como en el intervalo de aproximadamente 40-60 %, incluyendo aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, o en el intervalo de aproximadamente 50-60 %, tal como, por ejemplo, 55 % o 60 % de GD.

Además, la QPD se desacetila preferentemente a una forma aleatorizada durante el proceso de desacetilación (es decir, la desacetilación de la quitina, que es la manera preferida de obtener derivado de quitina adecuado para la presente invención), de modo que se reduce al mínimo la presencia de fracciones de *N*-acetil-*D*-glucosamina (A) o *D*-glucosamina (D) en bloques, A-A-A-A o D-D-D-D. Tras la hidrólisis por las quitinasas endógenas del organismo, dicho material desacetilado semialeatorio deseado produce una longitud óptima de oligómeros, en términos de su cantidad, peso molecular, bloqueo de 18 quitinasas de la familia y afinidad hacia proteínas similares a la quitinasa, para fines terapéuticos óptimos para la regeneración del tejido óseo.

El grado de desacetilación y la distribución de grupos acetilo restantes tiene una marcada influencia sobre las actividades osteogénicas de los polímeros y oligómeros de QPD. Cuanto menor es la desacetilación y más homogénea es la distribución de los grupos acetilo, mayor actividad osteogénica muestra la QPD. En una realización preferida de la invención, se favorece una distribución semihomogénea, es decir, ni una distribución en bloques como se ha mencionado anteriormente ni una distribución uniforme completamente homogénea de los grupos acetilo, lo que significa (por ejemplo, en la QPD con GD del 50 %), que los restos de *N*-acetilglucosamina no deben estar distribuidos al 100 % como cualquier otro monómero.

El peso molecular (PM) de la QPD a la que se hace referencia en el presente documento se refiere al peso molecular medio del polímero de QPD. El PM de la QPD afecta a diversas propiedades de las composiciones; estas incluyen resistencia mecánica, inyectabilidad, capacidad de moldeo, cohesión o segregación, capacidad de llenado, tiempo de fraguado, etc. El PM viable preferido está en el intervalo de 10-1.000 kDa, por consiguiente, el PM preferido de la QPD en las composiciones de la invención está dentro de dicho intervalo. Las propiedades de moldeabilidad y segregación se mejoran a medida que aumenta el PM; sin embargo, un PM muy alto puede no actuar favorablemente sobre la inyectabilidad y la capacidad de llenado. Para las composiciones de la invención, el intervalo preferido del material de quitina está entre 30 y 200 kDa.

Una mezcla de alto y bajo PM puede comprometer diversas propiedades en conflicto, por ejemplo, propiedades de inyectabilidad frente a propiedades de segregación. Por otro lado, la incorporación de QPD terapéutica en forma de oligómero puede acortar el proceso de curación. En ciertas realizaciones, las composiciones comprenden quitoligómeros parcialmente desacetilados, normalmente con una longitud del oligómero en el intervalo de aproximadamente 3-12 restos de azúcar en la cadena oligomérica, y un valor de GD en el intervalo de aproximadamente 30-70 %, como parte del material de QPD, tal como aproximadamente 5-25 % en peso del contenido total del material de QPD, tal como aproximadamente 5 %, 10 % o 15 %. Esto potenciará un comienzo precoz de la osteogénesis.

Una vez preparado y envasado el kit, se prefiere la esterilización con irradiación gamma. La irradiación gamma puede afectar al PM del material de QPD inicial, por lo que si el material de QPD inicial de las composiciones antes de la irradiación tiene un PM que varía entre 200 y 1000 kDa, la irradiación puede generar un PM final de 30-200 kDa tras la irradiación gamma. El PM inicial eficaz puede, en algunas realizaciones, variar de 10 a más de 1.500 kDa, y el PM final puede variar de 10 a 1000 kDa. El intervalo más preferido para el PM final está, como se ha mencionado anteriormente, en un intervalo de 30-200 kDa y, por consiguiente, un intervalo de PM inicial preferido está entre 20 y 1.000 kDa, tal como en el intervalo de 100-1.000 kDa, y más preferentemente en el intervalo de 200-1.000 kDa, medido mediante el sistema de GPC/SEC que usa un detector de dispersión de luz.

La dosis viable de irradiación gamma en el contexto del presente documento está preferentemente en el intervalo de 9 a 100 kGray, y la dosis preferida es óptima en el intervalo de 20-35 kGray.

Preferentemente, la QPD de las composiciones de la invención tiene un tamaño de partícula no superior a 500 µm. En un ambiente ácido, dicho material se disuelve rápidamente y reacciona con los fosfatos de calcio para regular las propiedades del cemento.

Como se ha mencionado, la presente invención tiene la QPD incorporada en la fracción sólida. Esto tiene la ventaja adicional de que se evita la posible degradación del ácido durante el almacenamiento. Esto garantiza una vida útil razonable del cemento, y evita el desarrollo de propiedades inferiores del cemento y pérdidas económicas.

También los fosfatos de calcio están comprendidos en la fracción de sólidos de la composición. En las composiciones preferidas de la invención, el fosfato de calcio formará hidroxilapatita poco precipitada cristalina, para garantizar una asimilación óptima y para formar tejido óseo en el cuerpo.

Preferentemente, la fracción sólida de la composición comprende un fosfato de calcio ácido y un fosfato básico. Tras la mezcla con la fracción líquida y la neutralización, los fosfatos de calcio conducen a la formación de hidroxilapatita precipitada. La proporción más favorable del calcio con respecto al fosfato, proporción de Ca/P, está en el intervalo

de aproximadamente 1,6 a 1,7; sin embargo, la proporción de Ca/P puede ser viable en el intervalo de 1,2 a 2,2, que es el intervalo preferido de acuerdo con la invención.

5 Por consiguiente, en una realización, los fosfatos de calcio son fosfato alfa-tricálcico y fosfato tetracálcico. Estos tienen preferentemente una pureza superior al 80 %. (De acuerdo con la experiencia de los inventores, también se puede usar una pureza inferior al 80 %, y puede que no produzca propiedades osteogénicas inferiores). En la presente invención, también se pueden usar otras combinaciones de fosfatos de calcio que conduzcan a la formación de hidroxilapatita.

10 El sulfato de calcio es frágil, y proporciona menos fuerza que los fosfatos de calcio, por tanto, tiende a tener velocidad de resorción más rápida que el fosfato de calcio en el organismo. Una mezcla de sulfato de calcio y fosfato de calcio puede combinarse beneficiosamente tanto para la tasa de resorción como para las propiedades mecánicas del cemento en el organismo.

15 El/los fosfato/s de calcio deben tener preferentemente un tamaño de partícula no superior a 180 µm, más preferentemente inferior a aproximadamente 100 µm. La resistencia mecánica es inversamente proporcional al tamaño de partícula. El tamaño más favorable es de 50 µm o inferior.

20 En algunas realizaciones, la composición comprende glicerofosfato de sodio en la fracción sólida. El glicerofosfato de sodio puede usarse para mejorar aún más las propiedades mecánicas del cemento y para ajustar la salinidad del cemento a las condiciones fisiológicas.

25 En otras realizaciones, también se pueden usar otros fosfatos, como alternativa o además del glicerofosfato de sodio, entre los que se incluyen el hidrógenofosfato de sodio, hidrógenofosfato disódico, etc.

30 Como se ha mencionado anteriormente, la invención proporciona además métodos que se basan en el uso de las composiciones de la invención para la curación de un hueso fracturado. Los métodos comprenden proporcionar una fracción de sólidos y una fracción líquida como se ha descrito anteriormente, y mezclar las dos fracciones entre sí en una proporción de la fracción de sólidos con respecto a la fracción líquida en el intervalo de 1:2 a 1:3, y más preferentemente en los intervalos descritos y definidos anteriormente en el presente documento, tal como, lo más preferentemente, en la proporción de aproximadamente 1:2. Las dos fracciones se mezclan, y la mezcla se deja curar durante un tiempo adecuado hasta que se obtiene una consistencia y una viscosidad deseadas; y, en este momento, comienza el "tiempo de trabajo" de la composición. Luego, se introduce la mezcla, preferentemente por inyección, en el sitio de la fractura ósea que se desea curar. El manejo de las composiciones se adapta bien a los procedimientos clínicos que implican la cirugía ortopédica. El producto puede usarse para reemplazar los injertos óseos en el caso del relleno de huecos óseos, para potenciar la consolidación en la curación de fracturas óseas, para potenciar la fusión tal como en operaciones de fusión espinal, ostectomía, por ejemplo, en cirugía periodontal, cirugía de cáncer de huesos, tal como operaciones quirúrgicas conservadoras de extremidades, reconstrucción de no consolidaciones de huesos periféricos, en la reparación de procesos ostáticos en procesos benignos, etc.

40 Se deduce que la invención también proporciona material de QPD como el descrito en el presente documento para su uso como un medicamento para la reparación y curación de los huesos en general, y, en particular, cuando la QPD se proporciona en un kit de composición según lo descrito en el presente documento.

45 **Ejemplos**

**Ejemplo 1:** Propiedades de los materiales de una composición particular de la invención con proporción de S/L de 1:2

50 Los componentes sólidos y líquidos se mezclan por separado y se combinan, y se mezclan con la espátula inmediatamente antes de su uso.

**Tabla 1 Composición**

Componente	Cantidad relativa
Fracción de sólidos:	
Fosfato tetracálcico	46
Fosfato alfa-tricálcico	35
Glicerofosfato de sodio	11
QPD, GD del 50 %	8
Fracción líquida	
Ácido fosfórico	20
Fosfato de calcio	4
agua	176

Textura: la composición de cemento justo después de la mezcla tiene la textura de una pasta lechosa al inicio del tiempo de trabajo. La resistencia a la inyección se mide con una jeringa B. Braun de 5 ml (DI de 12 mm y salida de 2 mm) en el intervalo de 15-30 N.

- 5 El tiempo de trabajo de la composición a temperatura ambiente (20-25 °C) es de 3-25 minutos desde la mezcla inicial, es decir, el tiempo de fraguado es de 25 minutos a temperatura ambiente, pero de hasta 3 horas a 3 °C.

Cuando se dispusieron 2 g de la composición en 5 ml de agua salina no tamponada (NaCl al 0,9 %), el pH inicial fue de 7,4. Tras 6 horas, el pH era 6,84; tras 1 día, de 6,47; y tras 5 días, de 5,94.

- 10 La cohesión de la composición se midió de la siguiente manera: se disponen 50 ml de agua salina (NaCl al 0,9 %) en un vaso de precipitados de 100 ml con un agitador magnético de 2,5 cm en la parte inferior y una red de malla 25 colocada a 1 cm de profundidad bajo la superficie. Se inyectan 0,5 ml de cemento listo para su uso sobre la malla (en un movimiento circular para proporcionar una forma de "anillo rizado"). La configuración se ilustra en la Figura 1.
- 15 Se agita la solución durante 10 min a una velocidad de 100 rpm. Se determina el peso exacto del cemento inyectado (pesando el peso de la jeringa antes y después de la inyección). Tras el período de agitación, se transfiere la solución a un tubo de medición de la turbidez, y se mide la turbidez y se expresa en UTN).

- 20 Curva de calibración: se preparó una suspensión madre usando el cemento respectivo como patrón. Se dispersó una parte pesada de cemento (con precisión de 0,0000 g) completamente para producir una turbidez de 1000 UTN. La suspensión madre se usó para preparar suspensiones patrón con 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 UTN mediante dilución en serie. Se preparó un gráfico lineal con la cantidad de cemento representada frente a la turbidez de la suspensión. Por lo tanto, midiendo la turbidez de las soluciones de ensayo después de los 10 min de agitación, se determinó la cantidad de cemento dispersado.

- 25 Con esta medición, se determinó que < 0,1 % de la composición de cemento se había disgregado y dispersado en la solución salina.

*Propiedades mecánicas adicionales:*

- 30 Se midió la resistencia a la penetración con una celda de carga, pulsando una aguja (3 mm de diámetro exterior) a la profundidad de 5 mm en la composición totalmente curada embebida en una placa de 96 pocillos,  $\Phi$  6,7 x 13 mm. La composición se curó mediante incubación en solución salina (NaCl al 0,9 %) a 37 °C durante 24 horas. La resistencia de la composición enumerada en la Tabla 1 (proporción de S/L de 1:2) se midió como  $8,08 \pm 0,34 \text{ N/mm}^2$  usando el dispositivo de ensayo MTS (MTS Insight 10, Eden Prairie, MN, EE.UU.) usando 6-8 repeticiones para cada composición.

- 40 La penetración también se ensayó para composiciones con una proporción de S/L variable. Una composición con una proporción de S/L de 1:1,5 tiene una resistencia a la penetración de  $17,25 \text{ N/mm}^2$ , que es casi el triple en comparación con la composición de S/L de 1:2, ( $6,221 \text{ N/mm}^2$ ), mientras que una composición con una proporción de S/L de 1:1 tiene una resistencia a la penetración medida de  $32,82 \text{ N/mm}^2$ .

- 45 La resistencia del cemento se calcula a partir de la fuerza de penetración a 5 mm de desplazamiento. Los primeros experimentos han demostrado una correlación lineal entre los ensayos de penetración descritos y el ensayo de compresión clásico (CCT).

**Ejemplo 2: Efecto de la desacetilación sobre las propiedades mecánicas**

- 50 Fuerza de inyección: se formularon dos composiciones como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero con QPD de dos valores de GD diferentes, del 50 % y del 70 %. El ensayo de inyección se realizó en una jeringa B. Braun de 5 ml con un DI de 12 mm y una salida de 2 mm usando un dispositivo de ensayo MTS. Los resultados se muestran en la Figura 1. (Ensayos realizados bien a 25 °C o a 3 °C, véase la Figura 2).

- 55 Resistencia a la compresión: se prepararon tres composiciones como en el Ejemplo 1, pero con QPD de tres valores de GD diferentes, del 40 %, 70 % y 94 %, y una proporción de S/L de 1. La resistencia a la compresión se ensayó con una celda de carga de 500 N con una velocidad de cruceta de 20 mm/min usando el dispositivo de ensayo MTS. La temperatura inicial del cemento se ajustó a 3 y 25 °C durante el ensayo. Los resultados se muestran en la Figura 3. Hay 5 repeticiones de cada tratamiento en el ensayo de compresión, cada una con un tamaño de  $\Phi$  9,6 x 15 mm. Se incubaron estas muestras para curarlas en agua salina (NaCl al 0,9 %) a 37 °C durante 24 h y las condiciones de ensayo fueron como las descritas para el ensayo de inyección.
- 60

Ejemplo 3: Ensayo *in vivo* de las composiciones en modelo de mandíbula de rata - optimización del grado de desacetilaciónIntroducción:

La mandíbula de rata (hueso de la mandíbula) es un modelo frecuentemente usado para los estudios de curación ósea ("Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers"; *Micron*, Volumen 39, expedido el 4 de junio de 2008, páginas 373-379, João Paulo Mardegan Issa *et. al.*; "Bone formation in trabecular bone cell seeded scaffolds used for reconstruction of the rat mandible"; *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Volumen 38, expedido el 2 de febrero de 2009, páginas 166-172, H. Schliephake, *et.al.*, "Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: A comparison of two carriers; *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*", Volumen 132, expedido el 4 de abril de 2005, páginas 592-597, Oneida A. Arosarena, Wesley L. Collins; "Spontaneous bone healing of the large bone defects in the mandible"; *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, Volumen 37, expedido el 12 de diciembre de 2008, páginas 1111-1116, N. Ihan Hren, M. Miljavec).

La mandíbula es un hueso metabólicamente activo sensible a la tensión constante causada por la alimentación y al roer. Los presentes inventores han desarrollado un modelo animal para la lesión ósea crítica en la mandíbula de rata usando análisis de micro TC para medir el crecimiento de nuevo hueso y la respuesta osteogénica, y el examen histológico para traducir las características mineralizadas de las construcciones de micro TC en el tejido óseo mineralizado. Un taladro de 4 mm de diámetro en el área media de la fosa masetérica de la mandíbula de la rata proporciona un hueco de tamaño crítico que afecta a las propiedades mecánicas del hueso (Figura 4). Esto garantiza que el hueso responda a la lesión, compensando el debilitamiento de la estructura ósea mediante la activación de respuestas osteogénicas apropiadas. El análisis de micro TC permitió la cuantificación de la mineralización usando una parte definida de la mandíbula (Figura 4). Esto resultó ser una excelente herramienta para evaluar el efecto osteogénico de los biomateriales inyectados en este hueco como implante óseo. En este estudio, el modelo se usa para evaluar el efecto estimulante del crecimiento óseo de diferentes derivados de quitina en el relleno de huecos óseos inyectables a base de fosfato de calcio. Estos derivados de quitina fueron tres polímeros de quitina desacetilados de manera diferente, desacetilados al 50 %, 70 % y 96 %, y un oligómero desacetilado al 50 % (T-ChOS™, Genis hf., Islandia). Basándose en los estudios previos de los presentes inventores sobre la mandíbula de rata, el tiempo del implante se ajustó a 7 días. La acetilación del polímero pareció ser de importancia para inducir la formación de nuevo hueso, mostrando que el polímero de GD del 50 % es el más activo, y el polímero de GD del 96 % es inactivo.

Materiales y métodos

Los derivados de quitina usados en el presente estudio fueron los siguientes:

QPD de GD 50. Grado de desacetilación del 50 %. (Mismo material que se describe en la Tabla 1).

QPD de GD 70. Grado de desacetilación del 70 %.

QPD de GD 96. Grado de desacetilación del 96 %.

Oligómero de GD 50 (T-ChOS™, Genis hf, Islandia). T-ChOS™ está vacío de monómeros y contiene menos del 10 % de dímero y trímero. El octámero es el oligómero más abundante en la composición.

El peso molecular medio de todos los polímeros resultó ser superior a 130 kDa a juzgar por la cromatografía de exclusión de tamaño.

Se produjeron kits de los cuatro materiales compuestos de implantes diferentes, conteniendo cada kit un componente sólido (fracción de sólidos) y un componente líquido (fracción líquida). El componente sólido (un tubo) contenía 0,155 g de derivado de quitina, 0,904 g de fosfato tetracálcico y 0,701 g de fosfato alfa-tricálcico, 0,220 g de glicerofosfato sódico y 0,098 g de hidróxido cálcico (peso total de fracción de sólidos de 2,078 g). El componente líquido (un tubo) contenía 0,398 g de ácido fosfórico y 3,504 g de agua, con un peso total de 3,902 g (proporción de S/L de 1:1,88).

Se dispusieron un componente sólido y un componente líquido en una bolsa de plástico laminada con aluminio y sellada térmicamente, produciendo un kit listo para su uso completo. Todos los kits se esterilizaron mediante irradiación gamma (20 KGy; Radiation Center, Oregon State University, EE.UU.).

Durante el funcionamiento y antes del implante, los componentes se mezclaron de una manera aséptica, se dispusieron en una jeringa y se mantuvieron a 4 °C hasta la implantación.

Los animales de ensayo eran ratas macho Sprague Dawley (260-280 g), suministradas por Taconic de Dinamarca. Los animales se examinaron clínicamente al llegar, y se dejaron para su aclimatación y crecimiento en la instalación experimental durante 30 días antes de la operación. El día de la operación, el peso medio de los animales era de 413 g, variando de 430 a 464 g. El experimento se realizó en virtud de una licencia del Comité islandés de Aprobación de Experimentos con Animales (Licencia n.º 0709-0405). Las operaciones fueron realizadas por un cirujano ortopédico y un anestesista, y las dosis de los medicamentos y el bienestar animal fueron supervisados por

un veterinario.

- 5 Se preparó la mandíbula izquierda de cada animal para la cirugía mediante el afeitado y la desinfección. Se accedió a la mandíbula a través de una incisión paralela y sobre el borde inferior de la mandíbula. Se accedió a la fosa masetérica por disección roma y atraumática de las fibras del músculo masetero. Se perforó un orificio de 4 mm a través de la parte central de la fosa masetérica, usando un taladro dental de 4 mm. Tras enjuagar completamente con agua salina estéril (5 ml), se inyectaron en el orificio 25  $\mu$ l de la formulación de ensayo experimental usando un dispensador Eppendorf o se dejó sin tratar (control de hueco vacío). Se cerraron las heridas quirúrgicas con suturas.
- 10 Se estableció un total de 6 grupos usando 39 animales. La Tabla 2 muestra la configuración experimental.

**Tabla 2.** Configuración experimental. Número de animales de cada grupo, tratamiento del orificio y duración de la fase de vida

N.º de animales	Tratamiento	Tiempo de implantación (días)
4	Hueco vacío	7
4	Polímero de GD del 70 %	0
8	Polímero de GD de 96 %	7
7	Polímero de GD de 70 %	7
8	Polímero de GD de 50 %	7
8	Polímero de GD de 50 %	7

- 15 Al finalizar, las ratas se anestesiaron con isoflurano y, bajo anestesia, se les realizó un desangrado terminal desde el corazón. Se diseccionó la mandíbula izquierda de la articulación mandibular y se colocó en formaldehído al 3,7 % en tampón de fosfato 50 mM, pH 7,0.

- 20 Se realizó una exploración en un escáner de micro TC (Nanotom de General Electric Inspection Technologies). Las muestras se fijaron en un cilindro de plástico cerrado lleno de la solución de fijación y se montaron en la mesa giratoria en el escáner de TC. Las exploraciones se realizaron con un espectro de Al y un espectro de plástico (PET) como puntos de referencia para la comparación del valor del gris. La ampliación fue de 4; el tamaño del vóxel, de 12,50  $\mu$ m/borde del vóxel; el número de imágenes recogidas, de 1.080 (tamaño de paso 0,33  $^\circ$ ), con un tiempo de exposición de 2.000 ms, un promedio de fotogramas de 3 y 1 fotograma omitido. Los ajustes de rayos X fueron de 25 100 kV, 125  $\mu$ A, usando el modo de tubo 0 y sin filtro.

La reconstrucción del volumen se realizó usando el software Datos-x que acompaña al escáner de TC. El análisis de los datos se realizó con Volume Graphics Studio Max 2.0 de Volume Graphics.

- 30 Se definió un volumen cilíndrico, que comprendía todo el hueso que se extiende hacia atrás desde el borde distal del molar inferior, incluyendo el proceso mandibular, proceso angular, proceso coronoide y el orificio con o sin un implante (Figura 3; LC). A través del corte del valor del gris/definición del valor del gris, se determinó el volumen total de hueso (hueso viejo y nuevo) y el material de implante dentro de este volumen. En el caso de las mandíbulas con implante, se definió un cilindro menor perpendicular al cilindro mayor, incluyendo el material del implante (Figura 3; SC). Se restó el volumen de material de implante de dentro de este cilindro del volumen total de hueso e implante determinado por el cilindro mayor. De esta forma, se obtuvo una estimación del volumen total de hueso (hueso nuevo y viejo) de las mandíbulas tratadas y no tratadas (Figura 3).

- 40 Tras la exploración de micro TC, se colocaron las muestras en la solución de fijación tamponada. Las muestras seleccionadas se descalcificaron durante 3 horas en Decalc (Histolab, n.º 00601, Gotemburgo, Suecia). A continuación, se deshidrataron las muestras, se embebieron en parafina, se seccionaron (2  $\mu$ m) y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se examinaron las secciones usando un microscopio óptico (Leica DM 2000, Alemania) conectado a una cámara digital (Leica DFC 290) y se fotografiaron.

#### 45 Resultados

- En el período de 7 días, hubo un aumento inducido por el quitosano acetilado en el volumen de hueso mineralizado de la mandíbula (Figura 4). Se calculó el volumen de hueso mineralizado medio (VHMM, en mm<sup>3</sup>) para cada grupo (Media  $\pm$  ETM). No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de control (grupo de hueco vacío y grupo del día cero, 69,4  $\pm$  3,1 y 71,1  $\pm$  2,3, respectivamente, Figura 5). El VHMM se correlacionó negativamente con el valor de % de GD para el polímero de quitina desacetilada; el grupo GD 96 tuvo un valor medio de 71,9  $\pm$  2,9; el grupo de GD 70, un valor de 84,2  $\pm$  4,5 y, el grupo GD 50 fue de 87,3  $\pm$  3,8 (Figura 5). En comparación con el grupo de hueco vacío, el VHMM en los grupos de GD 70 y GD 50 aumentó significativamente (18 y 23 % respectivamente). Curiosamente, el grupo de GD 96 (quitosano desacetilado al 96 %) no tiene un efecto significativo sobre el volumen de hueso mineralizado (Figura 5).

El material compuesto de oligómero (implante T-CHOST<sup>TM</sup>) indujo el volumen óseo en un 11 % (Figura 5). Esta inducción fue significativa ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, debido a sus inferiores propiedades fisicoquímicas, el implante T-

CHOS™ se deshacía con frecuencia y abandonaba el orificio. Esto fue evidente cuando se examinaron las exploraciones de micro TC. Faltaban grandes porciones de los implantes T-ChOS™ en los orificios perforados. El polímero es aparentemente esencial para la estabilidad mecánica de esta formulación de cemento óseo.

5 La Figura 6 muestra la comparación de la sección histológica y transversal de micro TC a través de la misma mandíbula de rata 14 días después del implante de la composición inyectable a base de polímero de GD del 70 %. La sección es de 1-2 mm frontal al orificio perforado. El tejido mineralizado (A, B y C), caracterizado como hueso nuevo por el análisis de micro TC, parecía ser tejido óseo recién formado a juzgar por las secciones teñidas con hematoxilina-eosina.

10 Todo el hueso nuevo tenía menos densidad que el hueso de la mandíbula original, a juzgar por el examen de micro TC y el examen histológico. Los preparados histológicos revelaron la formación de hueso trabecular con vascularización dentro de la excrecencia de hueso nuevo. La nueva excrecencia ósea siempre fue desde el periostio que cubre la superficie externa del hueso y no desde el propio defecto óseo (Figura 6). Por lo tanto, se puede afirmar que esta excrecencia ósea inducida por QPD se localizó distalmente desde el orificio perforado en toda la superficie del hueso mandibular, principalmente a lo largo de los sitios expuestos a la máxima tensión mecánica dentro de la mandíbula. Esto solo puede explicarse por la actividad de las pequeñas moléculas capaces de difundirse a través de los tejidos relacionados con el hueso. Lo más probable es que estas pequeñas moléculas sean oligómeros de QPD formados por hidrólisis *in situ* del polímero de QPD en el implante. Lo más probable es que esta hidrólisis esté catalizada por las 18 quitinasas de la familia expresadas por los glóbulos blancos (neutrófilos y macrófagos). Estas quitinasas activas escindirán los polímeros de quitina parcialmente acetilados para formar diversos tamaños de oligómeros de QPD. Dichos oligómeros de QPD se difunden desde la composición implantada a los tejidos adyacentes y median en esta potenciación del crecimiento óseo distal en respuesta al estrés mecánico del hueso.

#### 25 **Ejemplo 4:** Tratamiento del hueco óseo crítico en la tibia proximal de las ovejas

Se ensayó una composición como se describe en el Ejemplo 1 (Tabla 1) y el Ejemplo 2 mediante implantación en la epífisis de la tibia proximal de cuarenta y cinco ovejas de 5 años (edad  $5,83 \pm 0,71$ , media  $\pm$  DT). Todas las ovejas fueron operadas de manera similar, 15 se mantuvieron durante 3 meses para una evaluación a corto plazo y 15 se mantuvieron durante 13 meses para una evaluación a largo plazo. El experimento se realizó en virtud de una licencia del Comité islandés de Aprobación de Experimentos con Animales (Licencia n.º 0709-0405). Las operaciones fueron realizadas por un cirujano ortopédico y un anestésista, las dosis de medicamentos y el bienestar de los animales fue supervisado por un veterinario.

#### 35 Mezcla de los componentes líquido y sólido

El polímero de quitina parcialmente desacetilada usado en esta muestra poseía las siguientes propiedades: grado de desacetilación del 50 %; solubilidad del 100 % en solución al 1 % de ácido acético al 1 %; viscosidad de la solución 460 cP; turbiedad en solución <10 UTN; peso molecular medio aparente de 330 kDa; contenido de endotoxinas 93 UE/g.

Se vertieron los componentes sólido y líquido del kit en un vaso de plástico estéril, y se agitaron y se amasaron junto con una espátula estéril durante 2 minutos formando una suspensión viscosa.

#### 45 Procedimientos quirúrgicos

Se perforó un orificio de 8 mm de diámetro en el medio, entre los bordes anterior y posterior del hueso, y a la altura de las tuberosidades de la tibia izquierda y derecha de cada animal. El orificio de entrada se perforó en ángulo recto a través de la corteza y, a continuación, se dirigió el taladro en dirección ascendente en ángulo de 45 ° acabando bajo la base de la meseta tibial. El taladro no se enfrió durante el procedimiento de perforación. Tras la perforación, se enjuagó bien el orificio de perforación de los restos de hueso lavando abundantemente con 40-50 ml de agua salina estéril y una succión profunda. Tras mezclar los componentes líquido y sólido del kit de ensayo, se dispusieron 1,5 ml de la suspensión en una jeringa estéril de 5 ml montada con una punta de pipeta estéril, y se inyectó todo el contenido en el orificio taladrado, asegurándose de que el material llenara todo el espacio del orificio taladrado desde la meseta tibial, hacia abajo y hacia fuera de la abertura en la corteza. Los orificios de la pata izquierda se dejaron vacíos y se usaron como controles negativos. A continuación, se cerró la herida quirúrgica de ambas patas con suturas subcutáneas de Vicryl de iban de 4 a 0, y la piel, con 4-0 suturas intracutáneas continuas de Etilone 4-0. Tras la cirugía y una vez despiertos, los animales fueron trasladados de nuevo al corral de ovejas para su recuperación, donde fueron controlados cuidadosamente hasta que fueron a un ambulatorio.

#### 60 Tratamiento post mortem de las muestras

Se dispusieron muestras de hueso en formaldehído al 3,7 % en tampón fosfato 50 mM, pH 7,0, inmediatamente después de la explantación y, tras ello, se exploraron en un escáner de micro TC (Nanotome de General Electric Inspection Technologies) junto con los patrones de espectros de hidroxiapatita. También se exploraron muestras de forma cilíndrica preparadas *ex vivo*, y se dejaron fraguar y endurecer en agua salina durante 24 horas a 37 °C con el

fin de obtener datos a partir del punto de tiempo cero. Tras la exploración, se cortaron las muestras de hueso en cortes de 4 mm de espesor y se devolvieron al fijador tamponado durante un mínimo de 4 semanas más. Una vez completado el período de fijación, las muestras se colocaron en una solución de EDTA al 15 % a pH neutro para la descalcificación durante hasta 4 meses, renovando regularmente la solución de EDTA. Tras la descalcificación, las muestras se prepararon para histología (parafina) y se tiñeron usando hematoxilina-eosina.

#### Análisis de micro TC

Se sometieron los datos de micro TC primarios a la reconstrucción del volumen y a análisis de datos usando el software Datos-X y el Volume Graphics studio Max 2.0 para las gráficas de volumen. El volumen reconstruido comprendía toda la hipófisis de la tibia, que llegaba desde la meseta tibial y 3 cm en sentido descendente, comprendiendo la perforación y todo el posible material de implante que pudiera encontrarse fuera de la perforación. Mediante el corte del valor del gris/la definición del valor del gris, se determinó el volumen de hueso viejo, hueso nuevo y material de implante dentro de este volumen reconstruido. Aparecen concentraciones más altas de hidroxiapatita en los patrones en las imágenes de micro TC con un valor de la escala de los grises más brillante ("más blanco"). Como la hidroxiapatita es el principal componente en la atenuación de rayos X inducida por hueso calcificado, los valores de la escala de los grises de los patrones pueden usarse para estimar el grado y la distribución de la mineralización en las muestras. Al comparar los valores de la escala de los grises de los patrones de hidroxiapatita y de las muestras, se podría juzgar el grado de mineralización. Las superficies más brillantes en las imágenes de TC indican el tejido con el mayor grado de mineralización.

Para la evaluación cuantitativa, se definió un cilindro virtual de 4 mm de longitud y 3 mm de radio, y se orientó con cuidado concéntricamente con el eje longitudinal en la dirección de la perforación (Figura 7). Mientras se mantenía fija la orientación del cilindro, se fue aumentando el radio por etapas a 4, 5 y 6 mm, y se midió el volumen mineral en cada cilindro. Este análisis se repitió en todas las muestras, tanto en orificios vacíos (tibia izquierda) como en orificios con implante. Restando el cilindro más estrecho al más ancho, tal como un radio de 3 mm al radio de 4 mm (R4-R3), R5-R4 y R6-R5, se obtuvo el volumen de la fase mineral de una cubierta exterior (tubo) de 1 mm de cada cilindro. Se normalizó el volumen de la fase mineral de la cubierta de todos los cilindros con respecto a un volumen patrón de 1 mm<sup>3</sup>, obteniéndose la densidad mineral, y estos datos se analizaron estadísticamente usando el software SigmaStat y SigmaPlot.

#### Resultados

Se prepararon imágenes de micro TC en sección transversal a partir de todas las muestras que mostraban el material implantado y los tejidos circundantes en 3 planos. Estas imágenes se usaron para la evaluación visual y para definir los cilindros virtuales usados para la evaluación cuantitativa de la densidad mineral.

Se usaron secciones histológicas para la evaluación de las respuestas tisulares al material implantado, con énfasis en los signos de inflamación, reacción hacia el cuerpo extraño, formación de tejido cicatricial y tejido óseo recién formado.

#### Interpretación de los datos de micro TC

Tras 3 meses *in vivo*, la evaluación visual reveló una densa cubierta de hueso nuevo aparente rodeando el implante y bien conectada con el tejido óseo trabecular adyacente. Las islas de estructuras densas dentro del implante indicaban la formación de hueso disperso por todo el material (Figura 8). Tras 13 meses *in vivo*, esto se hizo todavía más pronunciado, la cubierta circundante parecía ser más gruesa y la formación de hueso dentro del implante era mucho más pronunciada que tras 3 meses *in vivo*.

La evaluación estadística de la densidad mineral en muestras *ex vivo* y muestras *in vivo* reveló una reducción del 21 % de la densidad mineral durante 3 meses *in vivo*. Entre 3 y 13 meses *in vivo*, la densidad mineral del implante había aumentado nuevamente en un 33 % (Figura 9).

A los 3 meses y a los 13 meses, no parecía que los orificios vacíos tuvieran increencia alguna de tejido mineralizado. Sin embargo, se hizo evidente una cubierta fina de tejido óseo denso rodeando el orificio vacío. Esto fue confirmado por la evaluación cuantitativa de los datos de R4-R3 (Figura 10). Esto reveló que el taladro de 8 mm era un hueco óseo crítico en este modelo.

Se cuantificaron los cambios en el implante y en el hueso midiendo la distribución del valor del gris a los 3 meses y a los 13 meses, usando los software MATLAB (MATrix LABoratory) y MIMICS (software de segmentación de imágenes médicas). Los resultados demuestran una diferencia distintiva en la distribución del valor del gris entre el implante y el hueso a los 3 meses. Sin embargo, a los 13 meses, la distribución del valor del gris del implante había cambiado, volviéndose similar a la distribución del valor del gris del hueso circundante. Estos resultados sugieren un cambio morfológico del implante durante el período de 10 meses que indica una conversión progresiva del material del implante en tejido óseo.

Confirmación mediante análisis histológico

5 La evaluación histológica de la tibia tras 3 meses mostró que el material de implante era completamente biocompatible sin signos de inflamación ni reacción hacia el cuerpo extraño. La formación de tejido cicatricial fue insignificante. Se hizo evidente una cubierta de tejido óseo nuevo con una intensa integración en el hueso trabecular adyacente que rodeaba todo el implante, y se formaron islas de hueso nuevo por todo el implante (Figura 11). Las imágenes del revestimiento de las secciones histológicas con las imágenes homólogas de las secciones de micro TC confirmaron que las zonas caracterizadas por una alta densidad (el mayor grado de atenuación de los rayos X) que rodeaban y se diseminaban por el implante, eran tejido óseo de nueva formación.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un kit de composición de cemento óseo para el tratamiento médico de curación ósea, que comprende:
  - 5 a. una fracción sólida que comprende quitina parcialmente desacetilada (QPD) con un grado de desacetilación en el intervalo de 40-75 % y fosfato de calcio;
  - b. una fracción líquida ácida que comprende agua y un ácido;
 siendo dichas fracciones proporcionadas en viales separados, para mezclarse antes de su uso, en el que la proporción en peso de la fracción de sólidos con respecto a la fracción líquida está en el intervalo de 1:2 a 1:3.
2. El kit de composición de cemento óseo de la reivindicación 1, en el que la QPD tiene un grado de desacetilación en el intervalo de 40-60 %, siendo preferentemente de aproximadamente el 50 %.
- 15 3. El kit de composición de cemento óseo de la reivindicación 1, en el que dicha fracción de sólidos comprende QPD en el intervalo de 3-30 % en peso, preferentemente en el intervalo de 5-15 % en peso.
4. El kit de composición de cemento óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha fracción líquida comprende uno o más ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido málico, ácido cítrico y ácido glutámico.
  - 20 5. El kit de composición de cemento óseo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha fracción líquida tiene una acidez equivalente a al menos un 5 % en peso de ácido fosfórico.
  - 25 6. El kit de composición de cemento óseo de la reivindicación 1, en el que dicha fracción líquida comprende además hidróxido de calcio.
  7. El kit de composición de cemento óseo de cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, que comprende una cantidad de QPD que está en el intervalo de 0,5-10 % en peso de las fracciones combinadas, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1-5 % en peso.
    - 30 8. El kit de composición de cemento óseo de cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en el que dicha QPD se ha disuelto y ha precipitado.
    - 35 9. El kit de composición de cemento óseo de cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en el que dicho fosfato de calcio comprende uno o más de entre fosfato tetracálcico, fosfato alfa-tricálcico y otros fosfatos de calcio que pueden formar precipitados de hidroxiapatita y/o brushita.
    - 40 10. El kit de composición de cemento óseo de la reivindicación 1, en el que la composición comienza a endurecerse a temperatura ambiente tras la mezcla, y tiene un tiempo de fraguado a temperatura ambiente en el intervalo de aproximadamente 15-30 minutos, teniendo dicha composición una viscosidad tras la mezcla, determinada por la inyectabilidad, que es inferior a 30 N cuando se mide con una jeringa B. Braun de 5 ml con 12 mm de DI y 2 mm de salida.
    - 45 11. El kit de composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en el que dicha composición no incluye proteína morfogénica ósea ni otro factor biológico seleccionado entre médula ósea, sangre, hueso y proteínas osteogénicas.
    - 50 12. El kit de composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, que comprende además sulfato de calcio en la fracción de sólidos.
    13. Un kit de composición de cemento óseo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso como medicamento para reparar y curar los huesos.
    - 55 14. Una mezcla de cemento óseo que comprende:
      - 60 - una fracción sólida que comprende quitina parcialmente desacetilada (QPD) con un grado de desacetilación en el intervalo de 40-75 % y fosfato de calcio, y una fracción líquida ácida que comprende agua y un ácido, en la que la proporción en peso de la fracción sólida con respecto a la fracción líquida está en el intervalo de 1:2 a 1:3, para formar una mezcla que es una mezcla de cemento semilíquida o pastosa,
 para su uso como un medicamento para reparar y curar los huesos, siendo la mezcla de cemento óseo para aplicarse en el sitio del hueso que se vaya a curar.

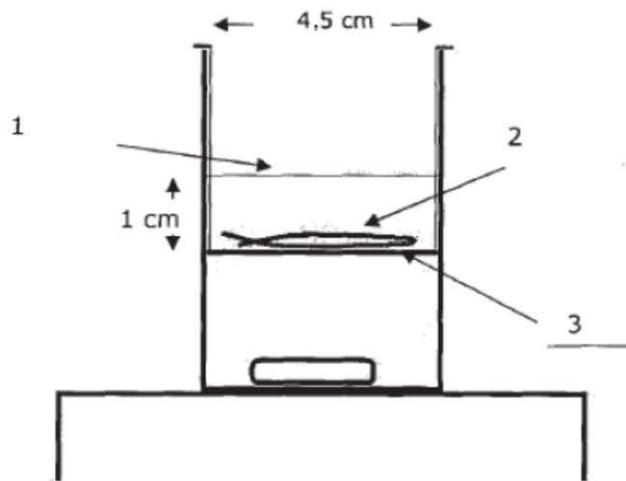


Figura 1

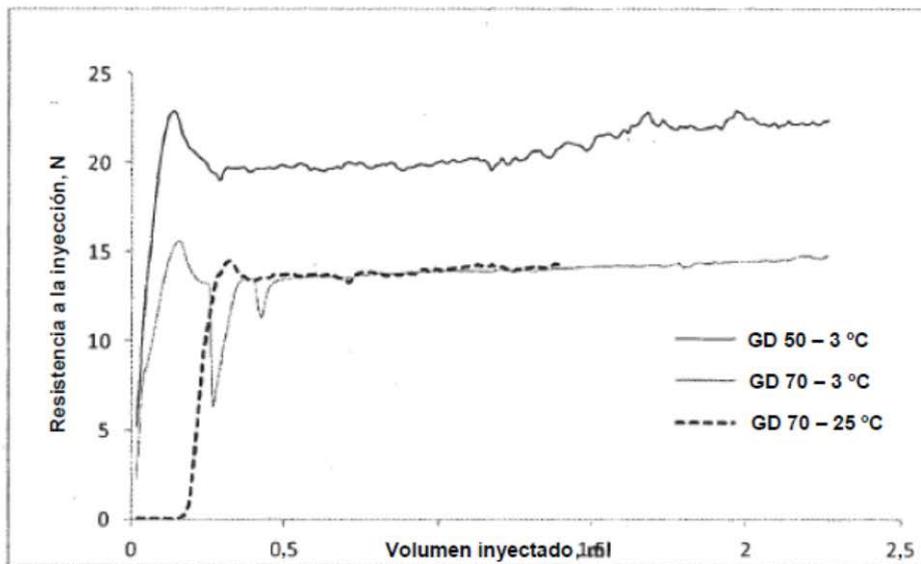


Figura 2

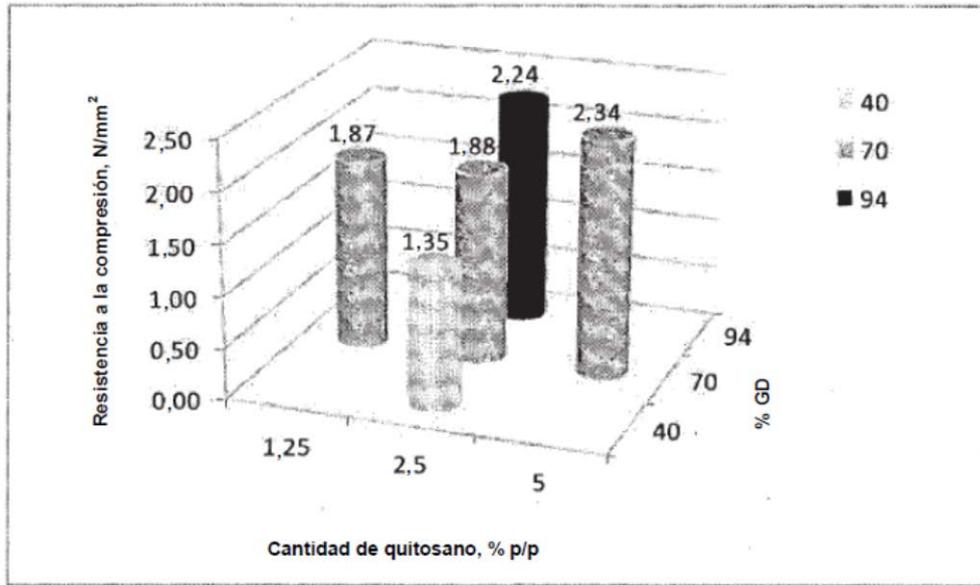


Figura 3

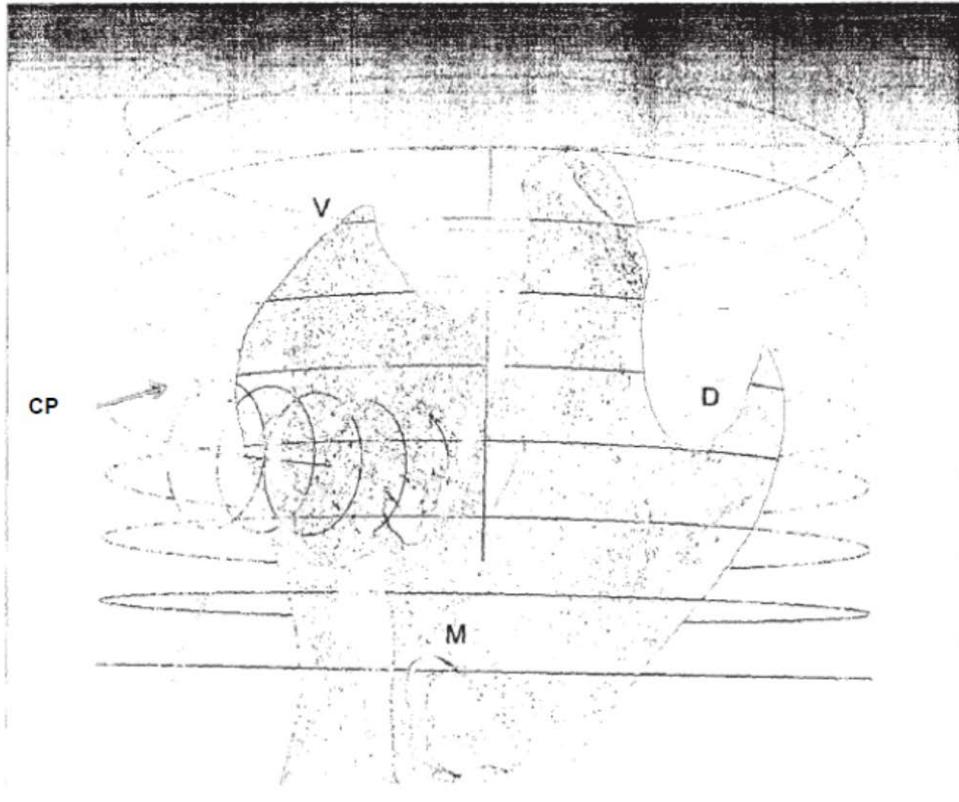


Figura 4

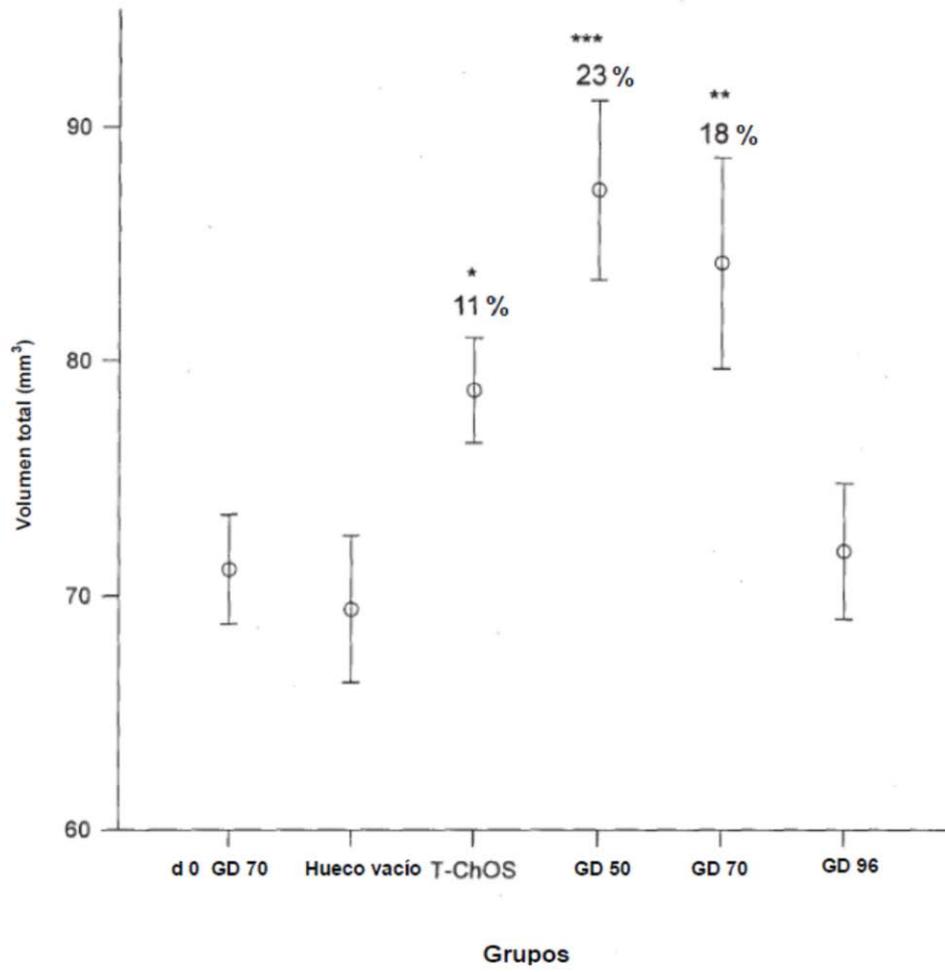
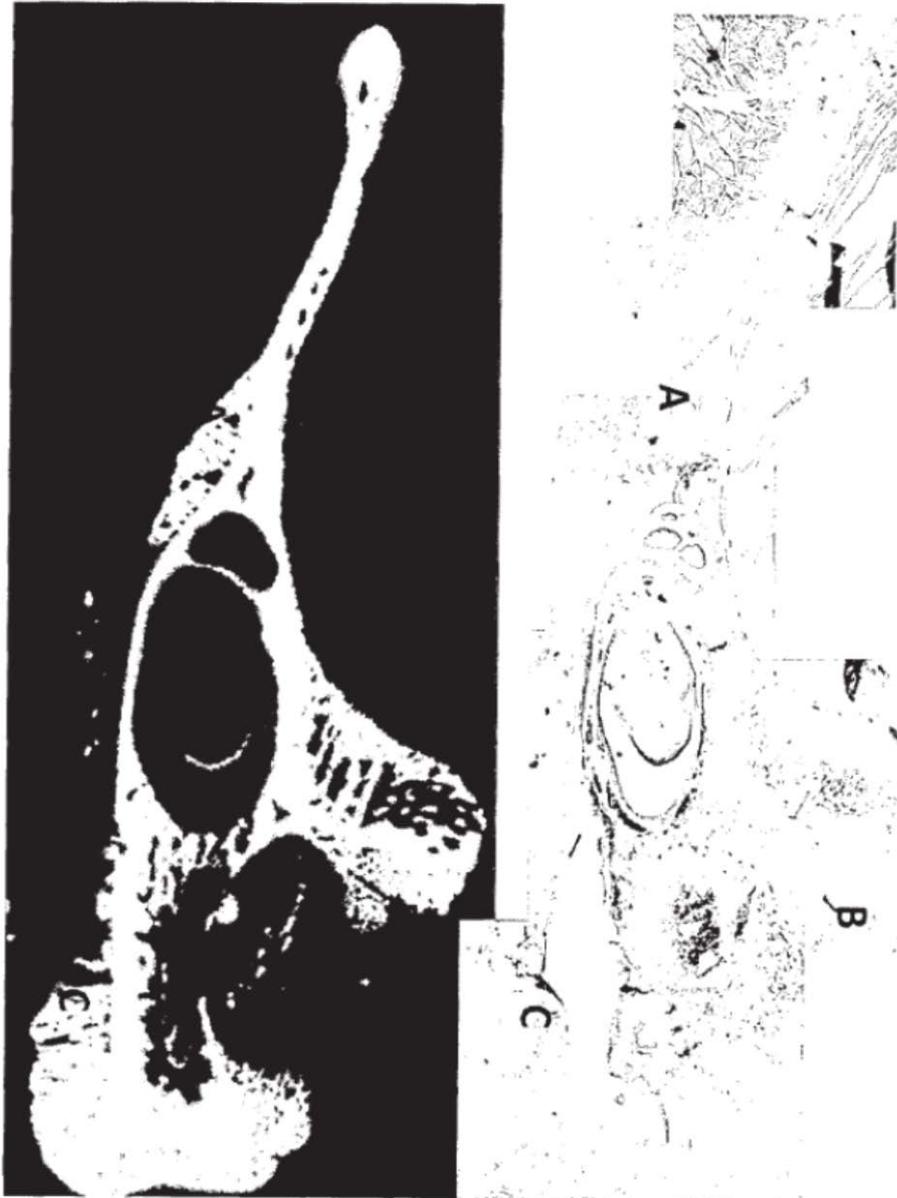


Figura 5

Figura 6



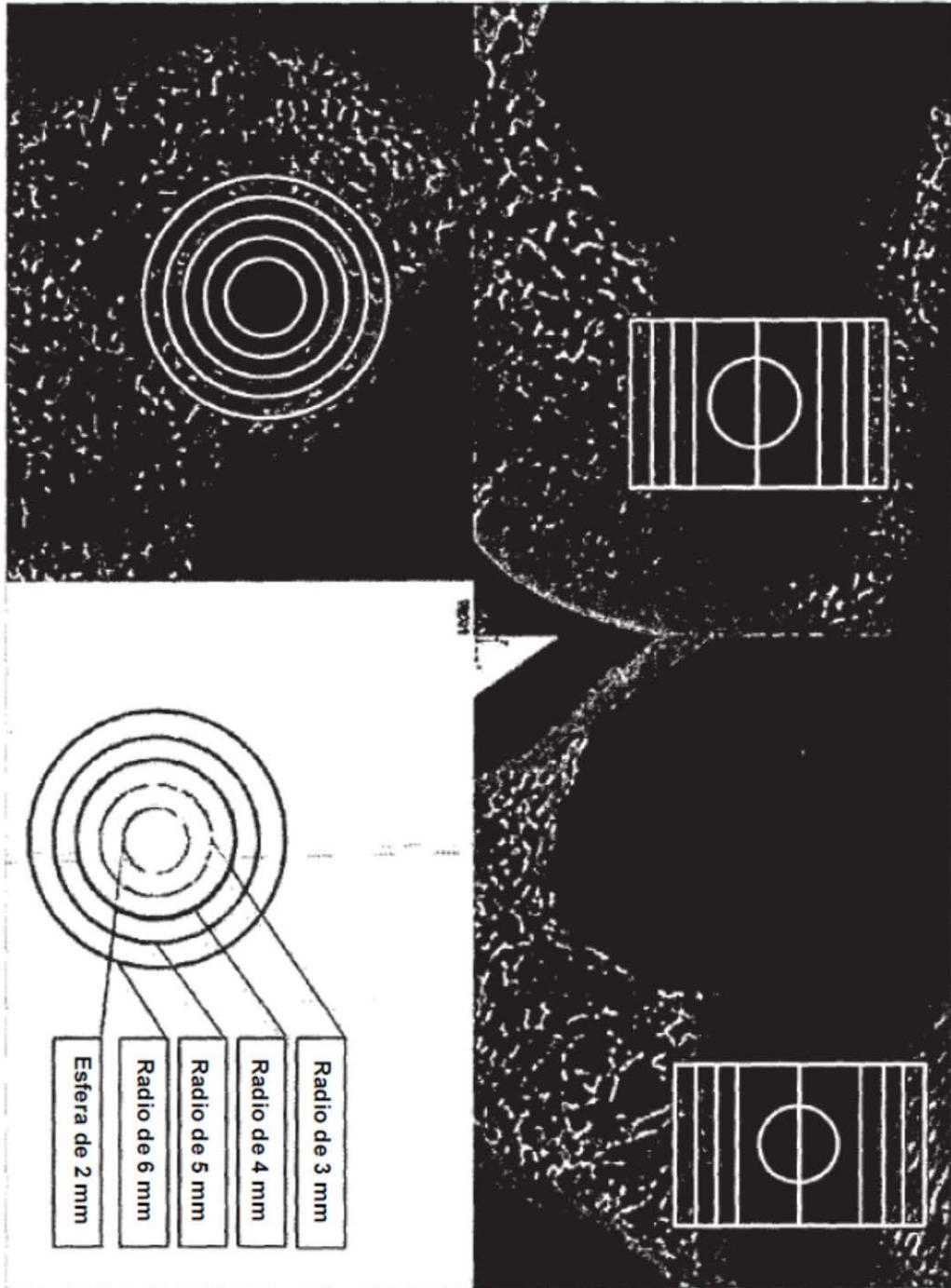


Figura 7

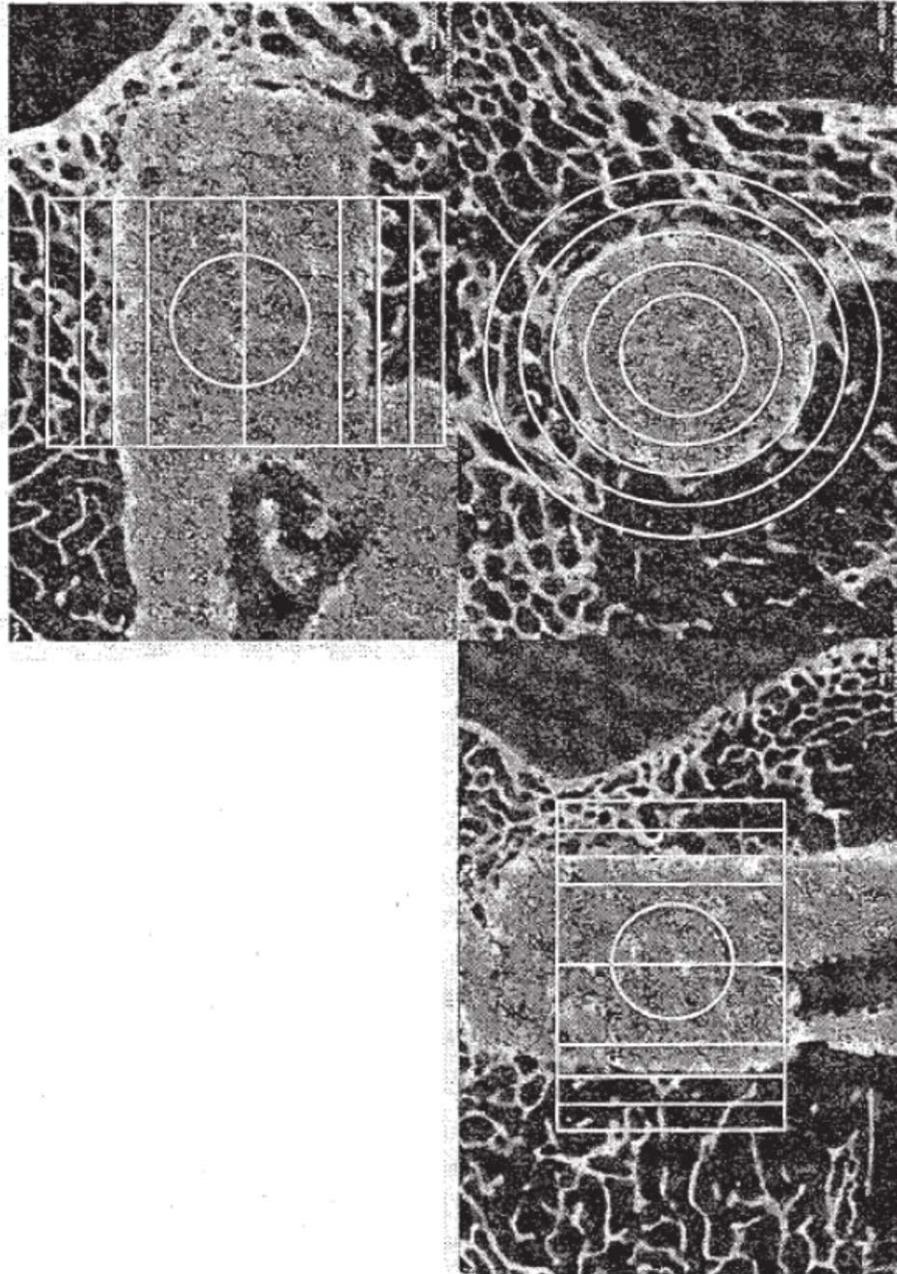


Figura 8

**Esfera R2**

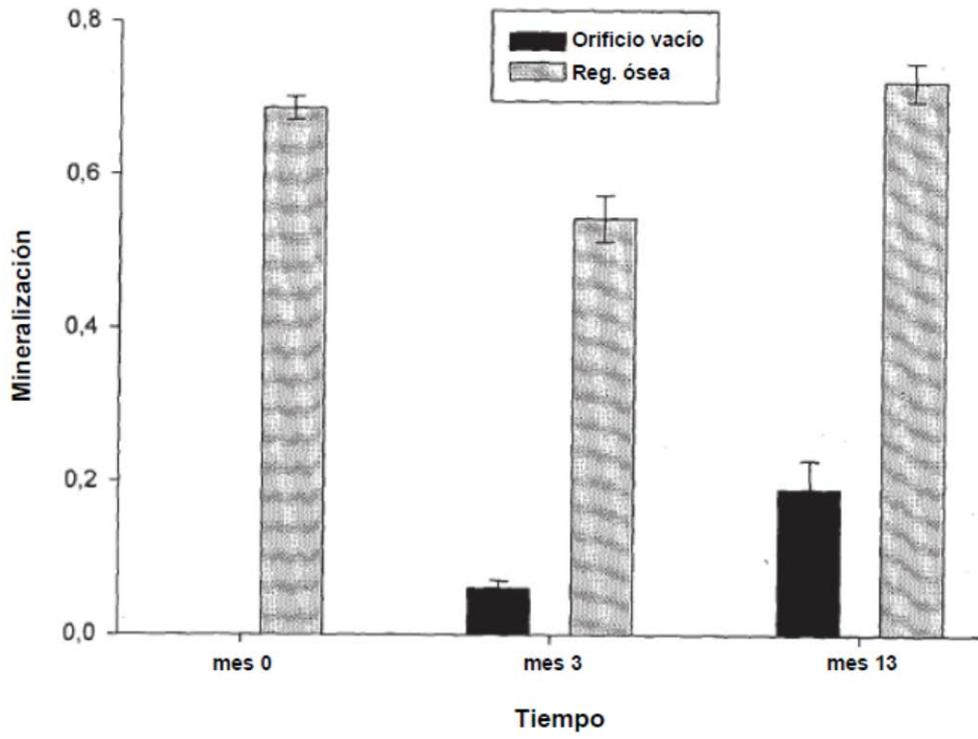


Figura 9

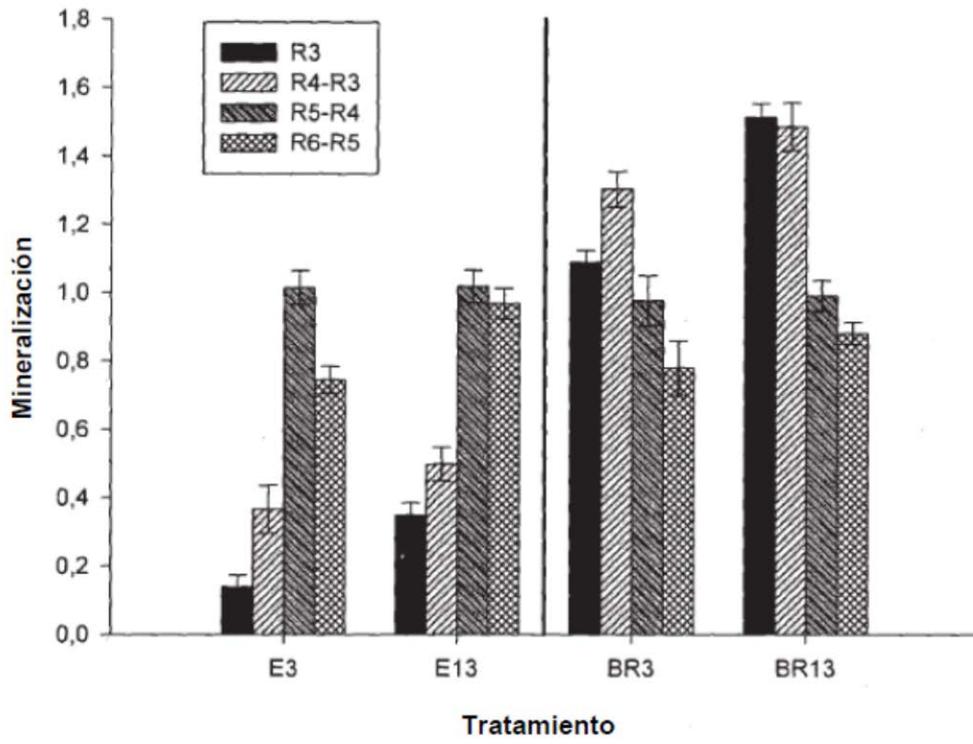


Figura 10

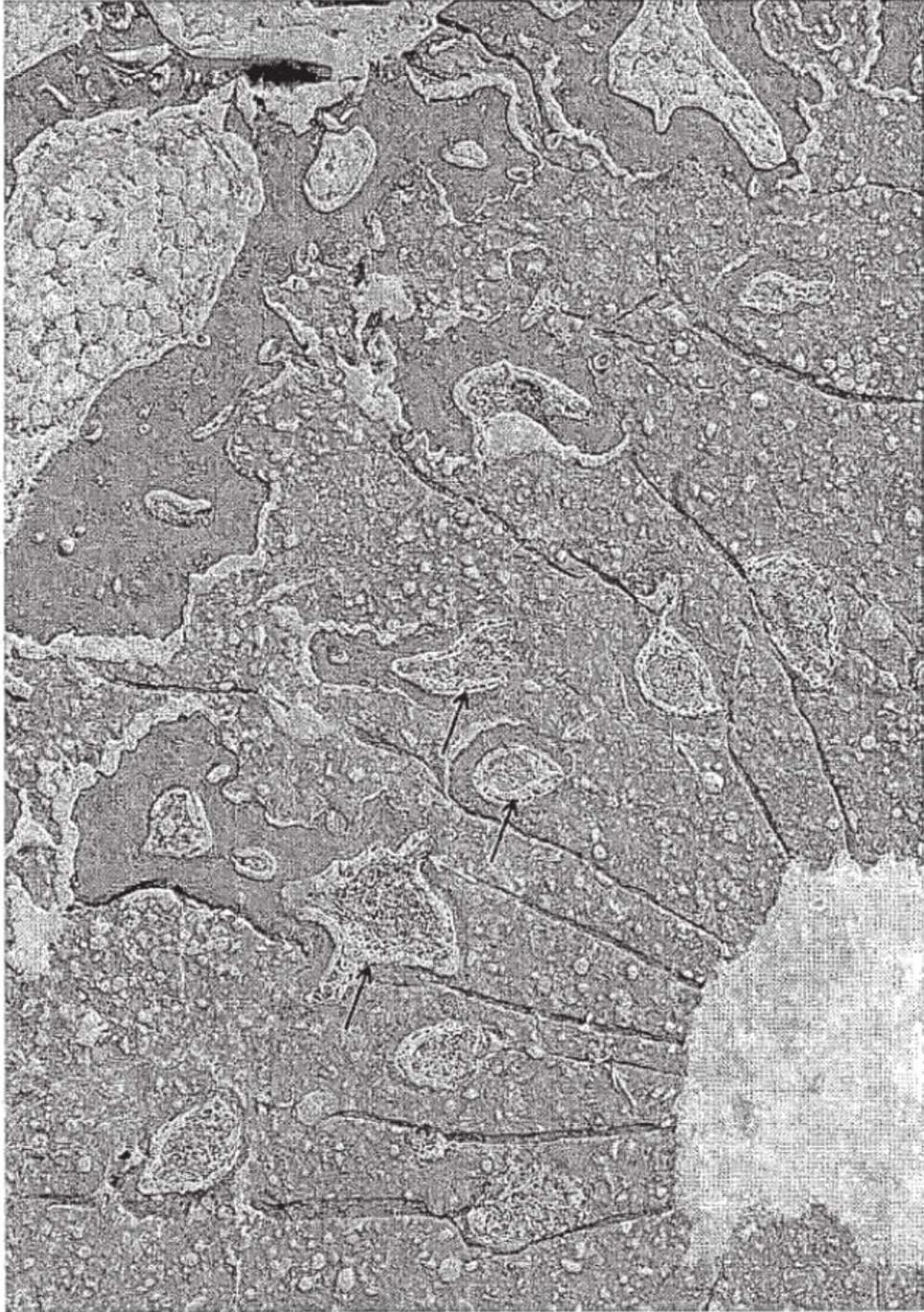


Figura 11