

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 832**

51 Int. Cl.:

A61L 27/02	(2006.01)
A61L 27/52	(2006.01)
A61L 27/14	(2006.01)
A61F 2/28	(2006.01)
A61L 27/18	(2006.01)
A61L 27/20	(2006.01)
A61L 27/46	(2006.01)
A61L 27/54	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014 PCT/KR2014/002659**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14157985**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014 E 14772876 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2978463**

54 Título: **Composición de injerto óseo y procedimiento de preparación de la misma**

30 Prioridad:

28.03.2013 KR 20130033859

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

09.10.2019

73 Titular/es:

**BIOALPHA CORPORATION (100.0%)
12 Bongeunsa-ro 114-gil Gangnam-gu
Seoul 135-715, KR**

72 Inventor/es:

**RYU, MI YOUNG;
CHO, NAM YUL;
SEO, JUN HYUK;
RYU, HYUN SEUNG y
LEE, SO MYOUNG**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 726 832 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

Composición de injerto óseo y procedimiento de preparación de la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición de injerto óseo y a un procedimiento de preparación de la misma, y, más en particular, a una composición de injerto óseo que tiene excelentes propiedades físicas, que comprende un hidrogel que comprende una combinación de cantidades específicas de poloxámero (copolímero de bloque de PEO-PPO-PEO) y HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa), y partículas de compuesto de fosfato cálcico, y a un procedimiento de preparación de la misma.

Técnica Anterior

10 Los biomateriales de injerto óseo desarrollados en una etapa inicial tienen la característica de que son inertes *in vivo*, pero el uso de los mismos ha estado significativamente limitado debido a las infecciones y reacciones inflamatorias, que se producen en el tejido circundante después de su implantación. Desde entonces, con el rápido desarrollo de las tecnologías de biomateriales basadas en materiales cerámicos y poliméricos, se han diseñado y desarrollado materiales que son biocompatibles en lugar de bioinertes, dando lugar al desarrollo de andamios
15 bioactivos para la regeneración de tejidos óseos, que varían dependiendo del sitio y propósito de uso. Se requiere que dichos andamios bioactivos para la regeneración de tejidos óseos tengan diferentes propiedades físicas dependiendo de la localización de la disposición del injerto, no sean tóxicos para el tejido circundante y tengan propiedades mecánicas relativamente altas en comparación con otros órganos artificiales. Dichos andamios bioactivos para la regeneración de tejidos óseos se han comercializado y desarrollado como diversos biomateriales
20 dependiendo de las propiedades de las materias primas y del uso pretendido de los mismos.

Todos los materiales que se han de injertar en el cuerpo humano, en particular, los materiales poliméricos para la regeneración de tejidos óseos, deben tener buena procesabilidad y moldeabilidad o tener buenas propiedades de polimerización *in situ* para ser adecuados para las heridas. Se requiere que estos materiales proporcionen un entorno adecuado para la adhesión, el crecimiento y la diferenciación de las células, y también se requiere que los
25 productos de degradación también sean biocompatibles. En particular, si la resistencia a la compresión y el límite de elasticidad de un material de injerto óseo son demasiado bajos, será difícil mantener las capacidades del material de injerto óseo para fijar su localización y mantener su forma externa en la etapa de disposición del implante o cierre después de la inyección o relleno denso del material de injerto óseo. Además, si la adhesividad de un material de injerto óseo es demasiado alta, se adherirá con facilidad a una herramienta quirúrgica durante la cirugía y, por tanto, será difícil rellenar con facilidad las lesiones óseas, lo que da como resultado una disminución de la manejabilidad. El documento US 2006/110357 divulga formulaciones de masilla ósea que comprenden fosfato tricálcico y poloxámero 407. Se puede añadir hidroxipropilmetilcelulosa para incrementar la viscosidad de la composición. La cantidad de poloxámero en el portador varía de un 35 a un 40 % en peso.

35 En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar una composición de injerto óseo que tenga biocompatibilidad y propiedades físicas adecuadas para su injerto en lesiones óseas y que tenga la propiedad de mantener la formulación durante un periodo específico después de su implantación.

Divulgación de la invención

Problema técnico

40 Con estos antecedentes, los autores de la presente invención han preparado una composición de injerto óseo usando un hidrogel que comprende una combinación de cantidades específicas de poloxámero y HPMC, y partículas de compuesto de fosfato cálcico, y han descubierto que la composición tiene propiedades físicas adecuadas para su uso como material de injerto óseo, completando de este modo la presente invención.

Solución al problema

45 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una composición de injerto óseo que tenga excelentes propiedades físicas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar una composición de injerto óseo que tenga excelentes propiedades físicas.

Efectos ventajosos de la invención

50 De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar una composición de injerto óseo que sea mejor en términos de resistencia a la compresión, límite de elasticidad y adhesividad en comparación con un hidrogel de poloxámero solo o un hidrogel que comprenda poloxámero y HPMC en cantidades fuera de los intervalos especificados en la presente invención mediante el uso de un hidrogel que comprenda una combinación de cantidades específicas de poloxámero y HPMC.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados de medir la resistencia a la compresión del hidrogel de poloxámero 407 a diversas concentraciones.

5 La FIG. 2 muestra los resultados de medir un cambio de la viscosidad después de añadir quitosano, HPMC o alginato a poloxámero para seleccionar un componente auxiliar que pueda mejorar la dispersabilidad y viscoelasticidad de un hidrogel que se usa en un material de injerto óseo.

La FIG. 3 muestra los resultados de realizar una prueba de resistencia a la compresión después de combinar HPMC con poloxámero en diversas proporciones de contenido para preparar hidrogeles.

10 La FIG. 4 muestra el cambio de las propiedades físicas de una composición de injerto óseo como una función del contenido de β -FTC en polvo. Específicamente, la FIG. 4a muestra el caso en el que el contenido de β -FTC en polvo es de un 70 % en peso; la FIG. 4b muestra el caso en el que el contenido de β -FTC en polvo es de un 60 % en peso; la FIG. 4c muestra el caso en el que el contenido de β -FTC en polvo es de un 50 % en peso; la FIG. 4d muestra el caso en el que el contenido de β -FTC en polvo es de un 45 % en peso; la FIG. 4e muestra el caso en el que el contenido de β -FTC en polvo es de un 40 % en peso; y la FIG. 4f muestra el caso en el que el contenido de β -FTC en polvo es de un 30 % en peso.

La FIG. 5 es un conjunto de vistas fotográficas que muestran el aspecto de las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 1.

20 Las FIGS. 6 y 7 muestran los resultados de examinar las resistencias al agua de las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 1. La FIG. 7a muestra los resultados para la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1, y la FIG. 7b muestra los resultados para la composición de injerto óseo del ejemplo 1.

Las FIGS. 8 y 9 muestran los resultados de examinar las propiedades físicas de las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 1.

25 La FIG. 10 es una vista fotográfica que muestra que una composición de injerto óseo del ejemplo 1 no se adhiere a los guantes quirúrgicos durante una operación quirúrgica realizada usando la composición de injerto óseo.

La FIG. 11 muestra los resultados de observar el nivel al que se mantiene la formulación de cada una de las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 1 al introducirse después de su implantación en lesiones óseas en animales.

30 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

Para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona una composición de injerto óseo que comprende:

A) un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico; y

35 B) un 45-70 % en peso de un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

40 La presente invención se caracteriza por que se puede proporcionar una composición de injerto óseo que tenga excelentes propiedades físicas mezclando partículas de compuesto de fosfato cálcico con un hidrogel que comprende una combinación de cantidades específicas de poloxámero y HPMC. Específicamente, se puede inyectar una mezcla de hidrogel y partículas de compuesto de fosfato cálcico y puede rellenar de forma densa lesiones óseas irregulares.

45 En otras palabras, es posible proporcionar una composición de injerto óseo que se pueda biodegradar con el paso del tiempo después del injerto óseo, debido a que comprende los polímeros biodegradables poloxámero y HPMC. Además, la composición de injerto óseo tiene resistencia a la compresión y límite de elasticidad altos, y, por tanto, tiene una excelente capacidad de mantener su volumen en el intervalo de temperaturas corporales después del injerto óseo, debido a que comprende un hidrogel que comprende una combinación de cantidades específicas de poloxámero y HPMC. Además, la composición de injerto óseo comprende un hidrogel y partículas de compuesto de fosfato cálcico en una proporción de mezcla adecuada, y, por tanto, puede tener una formulación, tal como un material de tipo masilla que resulte de la aglomeración del hidrogel y las partículas de compuesto de fosfato cálcico. Al mismo tiempo, el material de injerto óseo tiene baja adhesividad, de modo que no se adhiere a una herramienta quirúrgica durante la cirugía, y, por tanto, no se adhiere a una herramienta quirúrgica cuando rellena lesiones óseas, lo que sugiere que tiene una ventaja de excelente manejabilidad.

50 Como se usa en el presente documento, el término "composición de injerto óseo" se refiere a una composición para su uso como prótesis para lesiones óseas que se injerta en las lesiones óseas para rellenar las lesiones óseas.

Específicamente, el término "composición de injerto óseo" como se usa en el presente documento significa una composición de material de injerto óseo aloplástico sintético en base a un compuesto de fosfato cálcico.

La composición de injerto óseo de la presente invención está compuesta principalmente por partículas de compuesto de fosfato cálcico y un hidrogel.

5 Como el primer componente de la composición de injerto óseo de la presente invención, las partículas de compuesto de fosfato cálcico son similares al hueso natural y funcionan para inducir la osteoconducción y el crecimiento óseo.

Como se usa en el presente documento, el término "compuesto de fosfato cálcico" se refiere a un compuesto que comprende ácido fosfórico y calcio.

10 En la presente invención, el compuesto de fosfato cálcico puede ser fosfato tricálcico (FTC), fosfato monocálcico, fosfato tetracálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita o una combinación de dos o más de los mismos, pero no está limitado a los mismos.

Preferentemente, el fosfato tricálcico puede ser β -fosfato tricálcico (β -FTC; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

En un ejemplo de la presente invención, se usó β -FTC debido a su excelente osteoconductividad.

En la presente invención, el β -FTC puede estar preferentemente en forma de microesferas.

15 En la presente invención, el β -FTC se puede obtener secando por pulverización β -FTC en polvo, sinterizando el polvo seco a una temperatura de $1050 \square 1250$ °C, y clasificando el polvo sinterizado en el intervalo de 45 a 75 μm . Más específicamente, el β -FTC se puede obtener secando por pulverización β -FTC en polvo para formar una forma esférica y sinterizando el β -FTC en polvo esférico a una temperatura de $1050 \square 1250$ °C para incrementar la porosidad del polvo. Para obtener una composición de injerto óseo más uniforme, se puede clasificar el β -FTC en polvo sinterizado en el intervalo de 45 a 75 μm . La sinterización se puede realizar durante 1-3 horas. Lo más preferentemente, la sinterización se puede realizar durante 2 horas.

20 Las partículas de β -FTC resultantes obtenidas como se describe anteriormente pueden ser partículas microesféricas que tienen un diámetro de 45-75 μm . Además, las partículas de β -FTC resultantes pueden tener una porosidad de un 60 % o más alta como resultado de realizar los procedimientos de secado por pulverización y sinterización como se describe anteriormente.

25 Por tanto, como un aspecto preferente de la invención, la presente invención proporciona una composición de injerto óseo que comprende:

A) un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico en forma de microesfera; y

30 B) un 45-70 % en peso de un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Como el segundo componente de la composición de injerto óseo de la presente invención, el hidrogel es un gel formado dispersando un polímero que tiene una propiedad de transición sol-gel en agua y funciona para aglomerar las partículas de compuesto de fosfato cálcico para formar una formulación adecuada para el injerto óseo.

35 La presente invención se caracteriza por que se usan poloxámero e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) como polímeros biodegradables, que tienen una temperatura de transición sol-gel más baja que la temperatura corporal y pueden mantener el estado de gel en el intervalo de temperaturas corporales, para proporcionar una composición de injerto óseo que sea biocompatible y tenga una excelente capacidad de mantener su formulación después de su implantación.

40 Como se usa en el presente documento, el término "poloxámero" se refiere a un copolímero tribloque (PEO-PPO-PEO) que tiene dos cadenas de polietilenglicol (PEG) unidas a una cadena central de polipropilenglicol (PPG). En general, la proporción de PEG/PPG en el poloxámero puede variar en el intervalo de 1:9 a 8:2. El peso molecular del poloxámero puede estar en un amplio intervalo de 1.100 a 14.000 g/mol. El poloxámero es un polímero sensible a la temperatura. En la presente invención, el poloxámero funciona para conferir inyectabilidad y moldeabilidad a la composición de injerto óseo y para posibilitar que el material de injerto óseo se degrade rápidamente después de rellenar lesiones óseas para permitir que solo permanezca el componente de material de injerto óseo basado en fosfato cálcico. Para mantener la facilidad de inyección y moldeabilidad en el intervalo de temperaturas ambiente y la estabilidad de la formulación durante el almacenamiento y transporte a temperatura ambiente, se usa preferentemente un poloxámero de alto peso molecular que tenga una temperatura de transición sol-gel relativamente baja y alta viscosidad. Más preferentemente, se puede usar el poloxámero que tiene una temperatura de transición sol-gel de 4-35 °C para poder mantener el estado de gel a aproximadamente 37 °C (temperatura corporal) en la presente invención. Lo más preferentemente, se puede usar el poloxámero 407, que tiene una excelente capacidad de mantener el estado de gel a aproximadamente 37 °C (temperatura corporal) en la presente invención.

5 Como se usa en el presente documento, el término "hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)" se refiere a un polímero semisintético, inerte y viscoelástico, también llamado hipromelosa. En la presente invención, HPMC funciona para mejorar la elasticidad del hidrogel. En particular, a medida que se incrementa la viscoelasticidad del hidrogel, mejora la capacidad de fijar la localización del material de injerto óseo cuando se rellenan lesiones óseas, de modo que se puede minimizar ventajosamente la salida del material de injerto óseo hacia afuera.

10 En consecuencia, la viscosidad de HPMC en la presente invención puede ser preferentemente de 1.000-100.000 cp, y lo más preferentemente de 100.000 cp. Se añade HPMC en la presente invención en una cantidad mínima para inducir una alta viscosidad y alta elasticidad, y, a medida que se incrementa la viscosidad de la misma, se puede incrementar la capacidad de fijar la localización del material de injerto óseo y la densidad del relleno del material de injerto óseo, y se puede minimizar la adhesión del material de injerto óseo a una herramienta quirúrgica y a los guantes. Por tanto, lo más preferente es usar HPMC que tenga una viscosidad de 100,000 cp, que muestre la viscosidad más alta cuando se añada en una cantidad mínima.

15 En la presente invención, la composición de injerto óseo puede comprender además una proteína morfogenética ósea (BMP).

15 En la presente invención, la proteína morfogenética ósea puede ser BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, BMP-16, BMP-17, BMP-18, o una combinación de dos o más de las mismas, pero no está limitada a las mismas.

20 En la presente invención, la composición de injerto óseo de tipo masilla se puede disponer en una herramienta de inyección, tal como una jeringuilla o un tubo e inyectarse en una posición deseada. Después de su inyección, la composición de injerto óseo se puede introducir mediante una herramienta quirúrgica, de modo que rellene de forma densa lesiones óseas debido a la propiedad viscoelástica de la composición de injerto óseo.

25 De acuerdo con la presente invención, se usa el hidrogel que comprende una combinación de cantidades específicas de poloxámero y HPMC como se describe anteriormente, proporcionando de este modo una composición de injerto óseo que sea mejor en términos de resistencia a la compresión, límite de elasticidad y adhesividad en comparación con un hidrogel que comprende poloxámero solo o un hidrogel que comprende poloxámero y HPMC en cantidades fuera de los intervalos descritos anteriormente.

30 En particular, la composición de injerto óseo de la presente invención puede tener un límite de elasticidad que oscile de 1500 a 4000 g/cm². Cuando la composición de injerto óseo de la presente invención tiene un límite de elasticidad en el intervalo descrito anteriormente, presentará excelente viscoelasticidad y, por tanto, puede rellenar con facilidad lesiones óseas durante el injerto, lo que sugiere que muestra propiedades físicas adecuadas para su uso como material de injerto óseo.

35 Como se usa en el presente documento, el término "resistencia a la compresión" se usa de manera intercambiable con "resistencia" y significa la resistencia a la que la forma externa de la composición de injerto óseo se cambia mediante una fuerza externa. El término "límite de elasticidad" es un valor de propiedad física relacionado con la elasticidad de la composición de injerto óseo y significa la resistencia máxima a la que la composición de injerto óseo no se deforma mediante una fuerza externa. Por tanto, a medida que se incrementa la resistencia a la compresión y el límite de elasticidad de la composición de injerto óseo, es posible mantener las capacidades de la composición de injerto óseo para fijar su localización y mantener su forma externa en la etapa de disposición del implante después de la inyección o relleno denso de la composición de injerto óseo.

40 Como se usa en el presente documento, el término "adhesividad" significa la propiedad de adherirse al acero inoxidable. Es una fuerza que actúa en un sentido opuesto a la resistencia a la compresión, y (-) solo significa sentido. El valor absoluto más alto de la adhesividad significa que se requiere una mayor fuerza para separar la formulación de la composición de injerto óseo que se adhirió al acero inoxidable. Además, el valor absoluto de la adhesividad puede significar el grado de adhesión de la formulación de la composición de injerto óseo, no solo a una herramienta quirúrgica hecha de acero inoxidable, sino también a los guantes hechos de resina.

45 Se pueden medir la resistencia a la compresión, límite de elasticidad y adhesividad, que son fuerzas físicas que se miden en la presente invención, usando un reómetro convencional.

50 La composición de injerto óseo de la presente invención como se describe anteriormente comprende un hidrogel que se rellena entre partículas de compuesto de fosfato cálcico próximas entre sí. Después de la implantación de la composición de injerto óseo en lesiones óseas, el hidrogel se degrada y libera, las partículas de compuesto de fosfato cálcico se mantienen en el estado cerrado y el hueso crece en el espacio entre las partículas de compuesto de fosfato cálcico después de la liberación del hidrogel.

La presente invención también proporciona el uso de la composición de injerto óseo para el injerto óseo.

55 La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar la composición de injerto óseo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

1) preparar un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), y

2) mezclar un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico con un 45-70 % en peso del hidrogel biodegradable.

5 La etapa 1) es una etapa de preparar de un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). En esta etapa, se dispersan en agua cantidades predeterminadas de poloxámero y HPMC para preparar un hidrogel biodegradable.

10 Preferentemente, en la etapa 1), la HPMC se dispersa en primer lugar en agua para formar un gel de HPMC, y cuando la HPMC se haya dispersado completamente, se añade poloxámero al y se dispersa en el gel de HPMC, preparando de este modo un hidrogel que comprende poloxámero y HPMC.

15 Debido a que la HPMC no se disuelve en un estado de gel debido a su alta viscoelasticidad, el hidrogel se prepara preferentemente mediante el procedimiento descrito anteriormente en el que la HPMC se añade en primer lugar al agua para preparar un gel, y, a continuación, se añade poloxámero a la misma. Si se añade HPMC al gel de poloxámero, la HPMC se aglomerará y no se dispersará en el gel. Además, incluso en el caso en el que la HPMC se gelifique en primer lugar, se puede formar con facilidad una fase de gel solo cuando se disuelva la HPMC mientras se añade agua en pequeñas cantidades.

Por tanto, la etapa 1) puede comprender preferentemente las etapas de:

20 a) añadir HPMC a una cantidad de agua correspondiente a de 1/4 a 1/2 de la cantidad total de agua usada, y, a continuación, agitar la HPMC a una velocidad de 300-500 rpm en un estado de vacío para formar un gel de HPMC duro;

b) añadir gradualmente de dos a cuatro partes igualmente divididas de la cantidad restante de agua para diluir el gel; y

25 c) añadir poloxámero al gel de HPMC de una vez, seguido de agitación a una velocidad de 300-500 rpm en un estado de vacío.

Las clases de poloxámero y HPMC son como se describe con respecto a la composición de injerto óseo.

30 La etapa 2) es una etapa de mezclar un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico con un 45-70 % en peso del hidrogel biodegradable. En esta etapa, una cantidad predeterminada del gel de hidrogel preparado en la etapa 1) se mezcla con una cantidad predeterminada de partículas de compuesto de fosfato cálcico para obtener una composición de injerto óseo.

Las características y el procedimiento de preparación de las partículas de compuesto de fosfato cálcico son como se describe con respecto a la composición de injerto óseo.

En un modo de realización preferente de la presente invención, las partículas de compuesto de fosfato cálcico se pueden preparar de la siguiente manera.

35 El β -FTC en polvo puro se seca por pulverización para preparar un polvo esférico. A continuación, el β -FTC en polvo esférico se sinteriza a una temperatura de 1050 °C. Luego, las partículas sinterizadas se clasifican en el intervalo de 45-75 μ m.

En la etapa 2), se puede añadir y mezclar además la proteína morfogenética ósea (BMP).

La clase de proteína morfogenética ósea (BMP) es como se describe con respecto a la composición de injerto óseo.

40 En un modo de realización preferente de la presente invención, la composición de injerto óseo se puede preparar de la siguiente manera.

45 En primer lugar, se disponen 1 g de HPMC y 10 ml de agua purificada en una mezcladora de vacío de alta velocidad y se mezclan uniformemente entre sí a una velocidad de 400 rpm. A continuación, se añaden 10 ml de agua purificada al gel de HPMC gelatinoso semitransparente y se mezcla a la misma velocidad. A continuación, se añaden 14 ml de agua purificada al gel de HPMC, seguido de mezclado uniforme. Luego, se añaden 15 g de poloxámero 407 al gel de HPMC, seguido de mezclado a una velocidad de 400 rpm (un 30 % en peso de poloxámero y un 2 % en peso de hidrogel de HPMC). Se añaden 50 g de microesferas de β -FTC al gel resultante, y seguido de mezclado uniforme a una velocidad de 200 rpm o más baja.

50 En la presente invención, se puede disponer la composición de injerto óseo de tipo masilla preparada como se describe anteriormente en una jeringuilla e inyectarse en una posición deseada.

La presente invención también proporciona una composición para su uso en la implantación ósea que comprende:

A) un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico; y

B) un 45-70 % en peso de un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

5 Más preferentemente, la presente invención proporciona una composición para su uso en la implantación ósea que comprende:

A) un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico en forma de microesfera; y

B) un 45-70 % en peso de un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

10 La presente invención también proporciona un kit para la implantación ósea que comprende:

una composición de injerto óseo que comprende A) un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico, y B) un 45-70 % en peso de un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC); y una herramienta de inyección.

15 En la presente invención, la herramienta de inyección puede ser una jeringuilla, un tubo o similar.

Modo para la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Se ha de entender, sin embargo, que estos ejemplos son para propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

20 **Ejemplo de preparación 1: Preparación de la microesfera de β -FTC**

Se secó por pulverización β -FTC en polvo puro (Cerectron Co., Ltd., Corea) para preparar un polvo esférico. A continuación, se sinterizó el β -FTC en polvo esférico a una temperatura de 1050 °C, y las partículas sinterizadas se tamizaron en el intervalo de 45-75 μ m.

Ejemplo experimental 1: Selección de la concentración de poloxámero

25 Para determinar la concentración óptima de poloxámero en un hidrogel que se usa en un material de injerto óseo, se examinó el cambio de las propiedades físicas con la concentración de poloxámero.

Específicamente, se dispusieron el poloxámero 407 (BASF, Pluronic F-127) y agua purificada en una mezcladora de vacío de alta velocidad y se mezclaron uniformemente entre sí a diversas concentraciones para preparar hidrogeles de poloxámero. A continuación, se examinaron la resistencia, dureza, adhesividad y tensión máxima de cada uno de los hidrogeles preparados. En el presente documento, se midieron la resistencia a la compresión, límite de elasticidad y adhesividad de cada hidrogel con un reómetro (COMPAC-100, SUN SCIENTIFIC, Japón) a una temperatura de 37 °C.

30 Como resultado, se demostró que todas las propiedades del hidrogel que tenía una concentración de poloxámero de menos de un 20 % en peso eran significativamente inferiores a las del hidrogel que tenía una concentración de poloxámero de un 30 % en peso y que todas las propiedades del hidrogel que tenía una concentración de poloxámero de más de un 35 % en peso no se mejoraron significativamente en comparación con las del hidrogel que tenía una concentración de poloxámero de un 30 % en peso.

Específicamente, los resultados de examinar las propiedades físicas de cada uno de los hidrogeles que tienen concentraciones de poloxámero de un 25 % en peso, un 30 % en peso y un 35 % en peso se muestran en la FIG. 1 y tabla 1 a continuación.

40 La FIG. 1 muestra los resultados de medir las resistencias a la compresión del hidrogel de poloxámero 407 a diversas concentraciones.

Tabla 1

[Tabla 1]

Concentración de poloxámero 407	Resistencia (g/cm ²)	Adhesividad (g)
25 % en peso	140	83
30 % en peso	212	90

35 % en peso	237	113
--------------	-----	-----

A partir de los resultados en la FIG. 1 y en la tabla 1, se puede observar que el intervalo de concentraciones de poloxámero de un 30-35 % en peso es la concentración óptima.

Ejemplo experimental 2: Selección del componente auxiliar que mejora la dispersabilidad y viscoelasticidad y el contenido del mismo

5 Cuando un material de injerto óseo rellena lesiones óseas, la formulación se puede disolver mientras que el hidrogel se puede diluir con el torrente sanguíneo circundante. Para minimizar la dispersabilidad provocada por el torrente sanguíneo, se requiere mejorar la dispersabilidad y viscoelasticidad de un hidrogel que se usa en el material de injerto óseo. En particular, cuando el poloxámero entra en contacto con el agua, la superficie de contacto se degrada rápidamente, y por esta razón, se requiere añadir un componente auxiliar que pueda mejorar la viscoelasticidad y dispersabilidad provocada por el torrente sanguíneo. En este ejemplo, se seleccionaron preliminarmente quitosano, HPMC y alginato.

10 El quitosano, HPMC y alginato seleccionados preliminarmente se añadieron en la misma cantidad (un 0,5 % en peso) y se midió el cambio de la viscosidad provocado por cada uno de los hidrogeles auxiliares añadidos en una cantidad mínima. La medición de la viscosidad se realizó usando un viscosímetro para alta viscosidad (Viscometer DVII+ Pro, Brookfield, EE. UU.) a una velocidad de 20 rpm y a una temperatura de 37 °C.

Los resultados de la medición se muestran en la FIG. 2.

A partir de los resultados en la FIG. 2, se puede observar que la adición de HPMC mostró propiedades de viscosidad significativamente mejores en comparación con la adición de quitosano o alginato.

En consecuencia, se seleccionó HPMC como un componente auxiliar para el hidrogel.

20 Además, para determinar el contenido óptimo de HPMC, se combinó HPMC con poloxámero en diversas proporciones de contenido para preparar hidrogeles, y, a continuación, se realizó una prueba de resistencia a la compresión para los hidrogeles preparados. Cuando se añade HPMC para preparar hidrogeles altamente elásticos, es imposible medir las propiedades físicas de los hidrogeles con un viscosímetro de tipo rotativo para alta viscosidad. Por este motivo, las propiedades físicas se evaluaron mediante las resistencias a la compresión y se analizaron con un reómetro (COMPAC-100, SUN SCIENTIFIC, Japón) a 37 °C.

30 Cuando se añadió HPMC al hidrogel que tenía una concentración de poloxámero de un 35 % en peso, se observó la aglomeración de HPMC. Por este motivo, en el siguiente ensayo de resistencia a la compresión, se añadieron diversas cantidades de HPMC a cada uno del hidrogel que tenía una concentración de poloxámero de un 25 % en peso y el hidrogel que tenía una concentración de poloxámero de un 30 % en peso como se muestra en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

[Tabla 2]

P25H2 - poloxámero de un 25 % en peso más HPMC de un 2 % en peso	P30H2 - poloxámero de un 30 % en peso más HPMC de un 2 % en peso
P25H1 - poloxámero de un 25 % en peso más HPMC de un 1 % en peso	P30H1 - poloxámero de un 30 % en peso más HPMC de un 1 % en peso
P25H05 - poloxámero de un 25 % en peso más HPMC de un 0,5 % en peso	P30H05 - poloxámero de un 30 % en peso más HPMC de un 0,5 % en peso

Los resultados de la prueba de resistencia a la compresión se muestran en la FIG. 3.

35 A partir de los resultados en la FIG. 3, se puede observar que, cuando se añadieron diversas cantidades de HPMC (un 0,5 % en peso, un 1 % en peso y un 2 % en peso) a cada uno del hidrogel de poloxámero de un 25 % en peso y el hidrogel de poloxámero de un 30 % en peso, la resistencia a la compresión del hidrogel de poloxámero de un 30 % en peso era aproximadamente 1,5 veces más alta que la del hidrogel de poloxámero de un 25 % en peso.

40 En consecuencia, se prepararon hidrogeles que tenían un contenido de poloxámero fijo de un 30 % en peso y que contenían diversas cantidades de HPMC, y, a continuación, se examinaron las propiedades físicas de los mismos. Cuando el contenido de HPMC fue de más de un 2 % en peso, se requirió la fusión durante un largo periodo de tiempo a 80 °C, lo que dio como resultado una disminución de la manejabilidad. En consecuencia, en la siguiente prueba, se prepararon hidrogeles que tenían diversos contenidos de HPMC de un 0,5 % en peso, un 1 % en peso y un 2 % en peso, y, a continuación, se analizaron las propiedades físicas de los mismos.

Los resultados del análisis se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

[Tabla 3]

	Resistencia (g/cm ²)	Adhesividad (g)
poloxámero de un 30 % en peso + HPM de un 0,5 % en peso	140	150
poloxámero de un 30 % en peso + HPMC de un 1 % en peso	220	160
poloxámero de un 30 % en peso + HPMC de un 2 % en peso	305	190

A partir de los resultados en la tabla 3, se puede observar que el hidrogel que tenía un contenido de HPMC de un 2 % en peso mostró las mejores propiedades físicas. Cuando se añadió HPMC en una cantidad de más de un 2 % en peso, se incrementó extremadamente la viscoelasticidad del hidrogel, imposibilitando mezclar el poloxámero, y, por este motivo, el contenido máximo de HPMC se estableció en un 2 % en peso.

Por tanto, a partir de los resultados de los ejemplos experimentales 1 y 2 anteriores, se puede observar que el hidrogel tiene lo más preferentemente un contenido de poloxámero de un 30 % en peso, un contenido de HPMC de un 2 % en peso y un contenido de agua de un 70 % en peso.

Ejemplo experimental 3: Determinación del contenido de β -FTC

Se preparó un hidrogel que tenía un contenido de poloxámero de un 30 % en peso, un contenido de HPMC de un 2 % en peso y un contenido de agua de un 70 % en peso, que se determinó que eran los contenidos óptimos en los ejemplos experimentales 1 y 2 anteriores, y, a continuación, se prepararon composiciones de injerto óseo mezclando el hidrogel con diferentes cantidades de la microesfera de β -FTC preparada en el ejemplo de preparación 1, y se analizaron propiedades físicas de las mismas.

Los resultados del análisis se muestran en las FIGS. 4a a 4f. Específicamente, la FIG. 4a muestra el caso en el que el contenido de microesfera de β -FTC es de un 70 % en peso; la FIG. 4b muestra el caso en el que el contenido de microesfera de β -FTC es de un 60 % en peso; la FIG. 4c muestra el caso en el que el contenido de microesfera de β -FTC es de un 50 % en peso; la FIG. 4d muestra el caso en el que el contenido de microesfera de β -FTC es de un 45 % en peso; la FIG. 4e muestra el caso en el que el contenido de microesfera de β -FTC es de un 40 % en peso; y la FIG. 4f muestra el caso en el que el contenido de microesfera de β -FTC es de un 30 % en peso.

A partir de las FIGS. 4a a 4b, se puede observar que los hidrogeles están en forma de polvo debido al insuficiente contenido de gel y no se pueden inyectar. Por otra parte, a partir de las FIGS. 4c a 4f, se puede observar que los hidrogeles están en forma de masilla inyectable debido al suficiente contenido de gel.

En particular, en el caso de la FIG. 4c que muestra la composición de injerto óseo que tiene un contenido de microesfera de β -FTC de un 50 % en peso, es decir, una proporción de contenido de gel con respecto a microesfera de 1:1, se puede observar que la composición de injerto óseo de tipo masilla no se adhiere a la mano debido a su baja adhesividad, lo que sugiere que tiene buena manejabilidad. Además, en el caso en el que la proporción de contenido de gel con respecto a microesfera sea de 1:1, la tensión máxima de la composición de injerto óseo es alta y, por tanto, la composición tiene alta resistencia a una fuerza externa que se aplica a la misma. Por tanto, en este caso, se puede prevenir la pérdida del material durante el cierre, y se puede prevenir que el material se disuelva debido al sangrado de una superficie con incisión en un lecho quirúrgico. Además, debido a que el material de injerto óseo tiene baja adhesividad, no solo no se puede adherir a la mano, sino tampoco a un dispositivo, durante la cirugía.

Por lo tanto, los resultados anteriores sugieren que el contenido óptimo de microesfera de β -FTC es de un 50 % en peso y que se puede usar la microesfera de β -FTC en una cantidad que oscile de un 30 a un 55 % en peso en vista de la inyectabilidad.

Ejemplo 1: Preparación de la composición de injerto óseo de la presente invención

En base a los resultados de los ejemplos experimentales 1 a 3, se preparó una composición de injerto óseo de la siguiente manera.

En primer lugar, se dispusieron 1 g de HPMC y 10 ml de agua purificada en una mezcladora de vacío de alta velocidad y se mezclaron uniformemente entre sí a una velocidad de 400 rpm. A continuación, se añadieron 10 ml de agua purificada al gel de HPMC gelatinoso semitransparente y se mezclaron a la misma velocidad, después de lo cual se añadieron además 14 ml de agua purificada, y el gel de HPMC se mezcló uniformemente. A continuación, se añadieron 15 g de poloxámero 407 al gel de HPMC, seguido de mezclado a una velocidad de 400 rpm (hidrogel que comprende un 30 % en peso de poloxámero y un 2 % en peso de HPMC). Se añadieron 50 g de microesferas de β -

FTC al gel resultante y se mezclaron uniformemente a una velocidad baja de 200 rpm o más baja, obteniendo de este modo una composición de injerto óseo.

Ejemplo comparativo 1: Preparación de la composición de injerto óseo que tiene BMP-2 y que no contiene HPMC

5 En primer lugar, se mezclaron 35 g de poloxámero 407 y 65 g de agua purificada entre sí a 4 °C y se disolvieron completamente para preparar un gel que contenía un 35 % en peso de poloxámero 407. El gel que contenía un 35 % en peso de poloxámero 407 se dispuso en una jeringuilla de tipo Luer.

10 Se absorbieron 0,35 ml (un 70 % en peso en base a β -FTC) de solución de BMP-2 en una jeringuilla, que contenía 0,5 g de microesferas de β -FTC preparadas en el ejemplo de preparación 1, mediante el uso de una aguja de jeringuilla.

La jeringuilla que contenía el gel de poloxámero 407 y la jeringuilla que contenía las microesferas de β -FTC que tenía BMP-2 absorbida en la misma se conectaron a un conector de 3 vías, y, a continuación, el contenido de las dos jeringuillas conectadas se mezcló uniformemente usando el conector, obteniendo de este modo una composición de injerto óseo.

15 **Ejemplo comparativo 2: Preparación de la composición de injerto óseo que no contiene HPMC**

Se preparó una composición de injerto óseo de la misma manera que se describe en el ejemplo comparativo 1, salvo que no se usó la solución de BMP-2. En otras palabras, se preparó la composición de injerto óseo sin realizar el procedimiento de absorción de la solución de BMP-2 en las microesferas de β -FTC.

20 **Ejemplo experimental 4: Examen de la forma externa de la composición de injerto óseo de la presente invención y resistencia al agua de la composición de injerto óseo**

La FIG. 5 muestra los aspectos de las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 1.

Específicamente, la FIG. 5a muestra el aspecto de la composición de injerto óseo del ejemplo 1, y la FIG. 5b muestra el aspecto de la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1.

25 Como se puede observar a partir de los aspectos en las FIGS. 5a y 5b, la composición de injerto óseo de la presente invención tiene una forma altamente elástica y dura.

Además, se examinaron las resistencias al agua de las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 1.

Específicamente, las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y del ejemplo comparativo 1 se sumergieron en agua a 37 °C, y se observó si las formas externas de las mismas se mantenían con el paso del tiempo.

30 Los resultados de la observación se muestran en las FIGS. 6 y 7. La FIG. 7a muestra los resultados para la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1, y la FIG. 7b muestra los resultados para la composición de injerto óseo del ejemplo 1. Como se puede observar en las FIGS. 6 y 7, la composición de injerto óseo de la presente invención tiene alta resistencia al agua y, por tanto, la forma externa de la misma se puede mantener durante un periodo de tiempo que sea al menos dos veces más largo que el de la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1. En particular, la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1 en agua a 37 °C perdió la capacidad de fijar la formulación a partir de los 3 minutos, y la difusión de la misma en agua fue intensa después de 30 minutos, lo que sugiere que se produjo la pérdida de la composición de injerto óseo, mientras que la composición de injerto óseo del ejemplo 1 mantuvo estable su forma durante 30 minutos, lo que sugiere que tiene baja dispersabilidad en la sangre.

40 **Ejemplo experimental 5: Examen de las propiedades físicas de la composición de injerto óseo de la presente invención**

Se examinaron las propiedades físicas de las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y de los ejemplos comparativos 1 y 2.

Los resultados del examen se muestran en la tabla 4 a continuación y las FIGS. 8 y 9.

45 **Tabla 4**

[Tabla 4]

	Resistencia a la compresión (g/cm ²)	Límite de elasticidad (g/cm ²)	Adhesividad (g)
Ejemplo	153	110	-70

	Resistencia a la compresión (g/cm ²)	Límite de elasticidad (g/cm ²)	Adhesividad (g)
comparativo 1			
Ejemplo comparativo 2	142	93,36	-50
Ejemplo 1	3340	2253,33	-10

- 5 Como se puede observar en la tabla 4 y en las FIGS. 8 y 9, la composición de injerto óseo del ejemplo 1 tiene mejores propiedades físicas que las composiciones de injerto óseo de los ejemplos comparativos 1 y 2. En particular, se pudo observar que la composición de injerto óseo del ejemplo 1 tenía alta resistencia y, por tanto, tenía alta resistencia a una fuerza externa aplicada a la misma, lo que sugiere que se puede prevenir la pérdida del material durante el cierre y que se puede prevenir que el material se disuelva debido al sangrado de una superficie con incisión en un lecho quirúrgico. Además, se puede observar que la composición de injerto óseo del ejemplo 1 mostró un alto límite de elasticidad debido a su propiedad altamente elástica, mientras que la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1 no tuvo elasticidad, y, por tanto, mostró un valor del límite de elasticidad prácticamente igual a la resistencia a la compresión.
- 10 Además, se pudo observar que la composición de injerto óseo del ejemplo 1 tenía baja adhesividad y, por tanto, no se adhería a los guantes quirúrgicos como se muestra en la FIG. 10.

Ejemplo experimental 6: Prueba en animales para la composición de injerto óseo de la presente invención

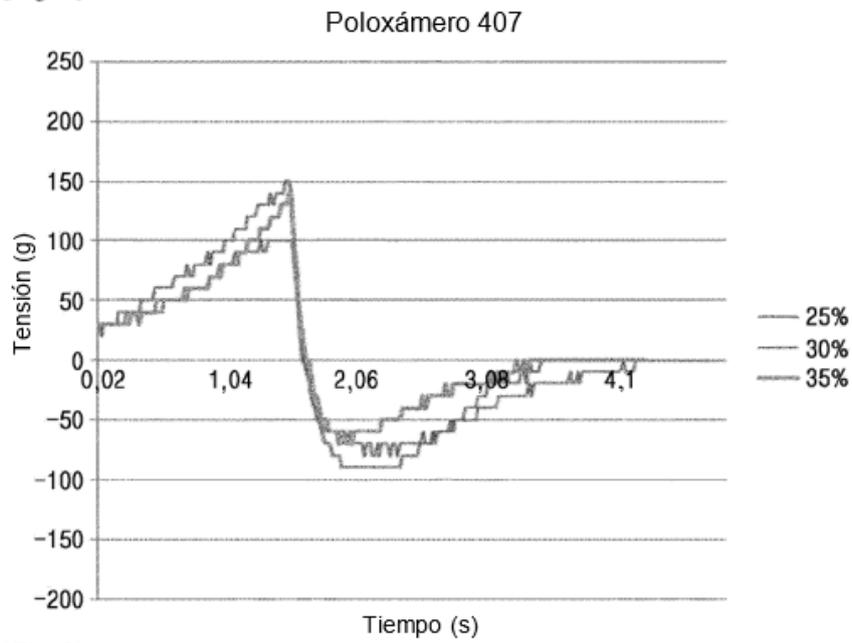
Se implantó cada una de las composiciones de injerto óseo del ejemplo 1 y de los ejemplos comparativos en lesiones óseas en animales, y, a continuación, se evaluó el nivel al que la formulación se mantenía al introducirse.

- 15 Los resultados de la evaluación se muestran en la FIG. 11. Específicamente, la FIG. 11a muestra la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1 inmediatamente después de su inyección; la FIG. 11b muestra la composición de injerto óseo del ejemplo 1 inmediatamente después de su inyección; la FIG. 11c muestra la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1, introducida después de su inyección; y la FIG. 11d muestra la composición de injerto óseo del ejemplo 1, introducida después de su inyección.
- 20 Como se puede observar en la FIG. 11, la composición de injerto óseo del ejemplo comparativo 1 comenzó a humedecerse inmediatamente después de su inyección y se dispersó alrededor del área circundante después de su introducción, mientras que la composición de injerto óseo del ejemplo 1 mostró resistencia a la humectación inmediatamente después de su inyección y no fluyó al tejido circundante después de su introducción.

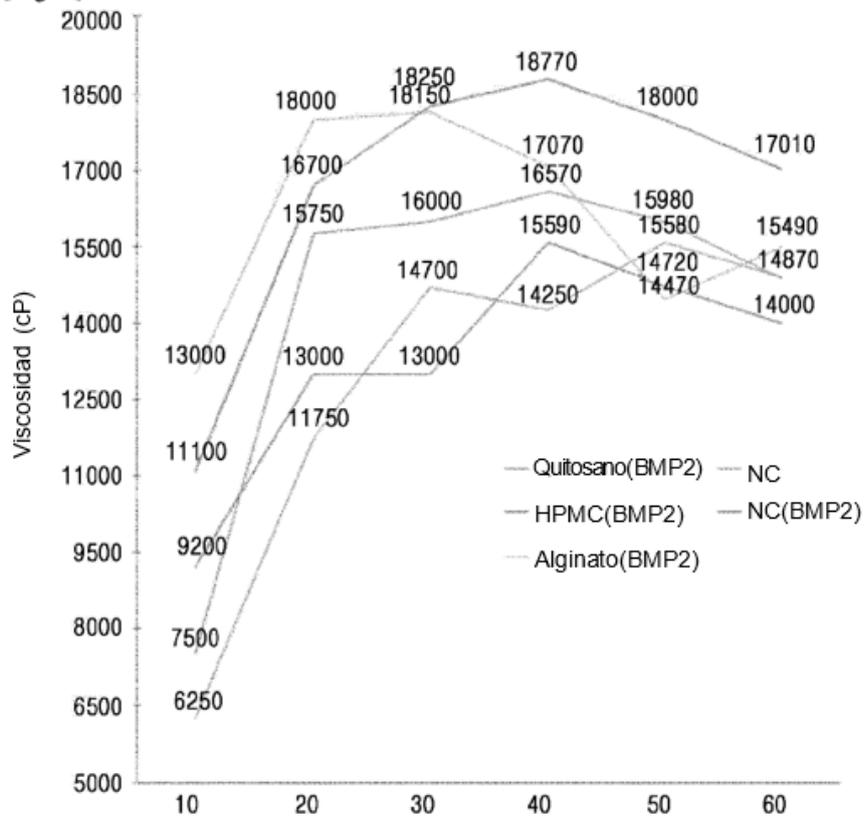
REIVINDICACIONES

1. Una composición de injerto óseo que comprende:
 - A) un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico; y
 - B) un 45-70 % en peso de un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).
2. La composición de injerto óseo de la reivindicación 1, en la que la composición tiene un límite de elasticidad de 1500-4000 g/cm².
3. La composición de injerto óseo de la reivindicación 1, en la que el poloxámero tiene una temperatura de transición sol-gel de 4-35 °C.
4. La composición de injerto óseo de la reivindicación 1, en la que la composición comprende el hidrogel que se rellena entre partículas de compuesto de fosfato cálcico próximas entre sí.
5. La composición de injerto óseo de la reivindicación 1, en la que el compuesto de fosfato cálcico es fosfato tricálcico (FTC), fosfato monocálcico, fosfato tetracálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita o una combinación de dos o más de los mismos.
6. La composición de injerto óseo de la reivindicación 5, en la que el fosfato tricálcico es β-fosfato tricálcico (β-FTC).
7. La composición de injerto óseo de la reivindicación 6, en la que el β-FTC está en forma de microesferas.
8. La composición de injerto óseo de la reivindicación 7, en la que el β-FTC se obtiene secando por pulverización β-FTC en polvo, sinterizando el polvo seco a una temperatura de 1050-1250 °C y tamizando el polvo sinterizado en el intervalo de 45-75 μm.
9. La composición de injerto óseo de la reivindicación 1, en la que el poloxámero es poloxámero 407.
10. La composición de injerto óseo de la reivindicación 1, en la que la HPMC tiene una viscosidad de 1.000-100.000 cp.
11. La composición de injerto óseo de la reivindicación 1, que comprende además proteína morfogenética ósea (BMP), y preferentemente en la que la proteína morfogenética ósea es BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, BMP-16, BMP-17, BMP-18, o una combinación de dos o más de las mismas.
12. Un procedimiento para preparar una composición de injerto óseo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - 1) preparar un hidrogel biodegradable que contiene, en base a 100 partes en peso del hidrogel, 25-35 partes en peso de poloxámero y 0,5-2 partes en peso de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), y
 - 2) mezclar un 30-55 % en peso de partículas de compuesto de fosfato cálcico con un 45-70 % en peso del hidrogel biodegradable.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la proteína morfogenética ósea (BMP) se añade y mezcla además en la etapa 2), y preferentemente en el que la proteína morfogenética ósea es BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, BMP-16, BMP-17, BMP-18, o una combinación de dos o más de las mismas.
14. Un kit para la implantación ósea que comprende: una composición de injerto óseo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y una herramienta de inyección.
15. El kit de la reivindicación 14, en el que la herramienta de inyección es una jeringuilla o un tubo.

[Fig. 1]

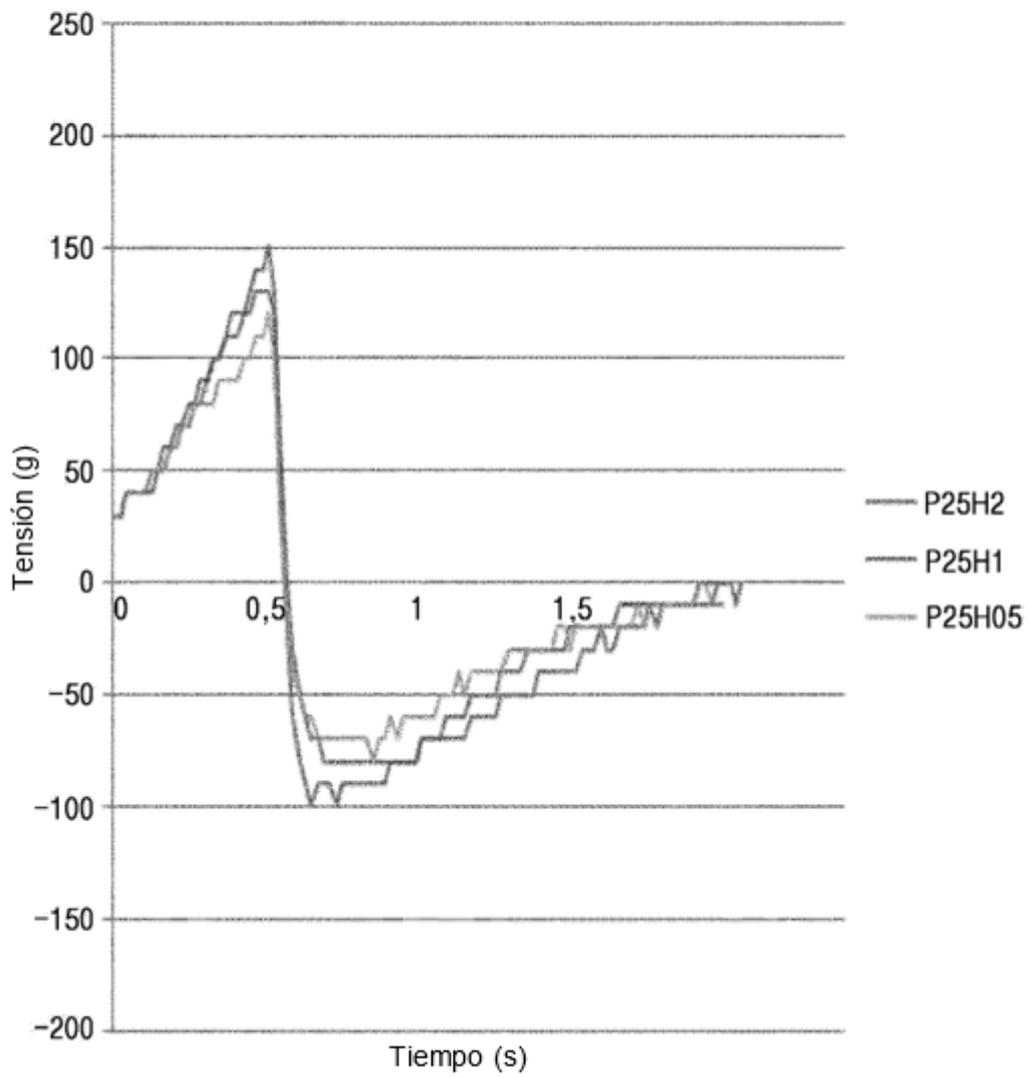


[Fig. 2]

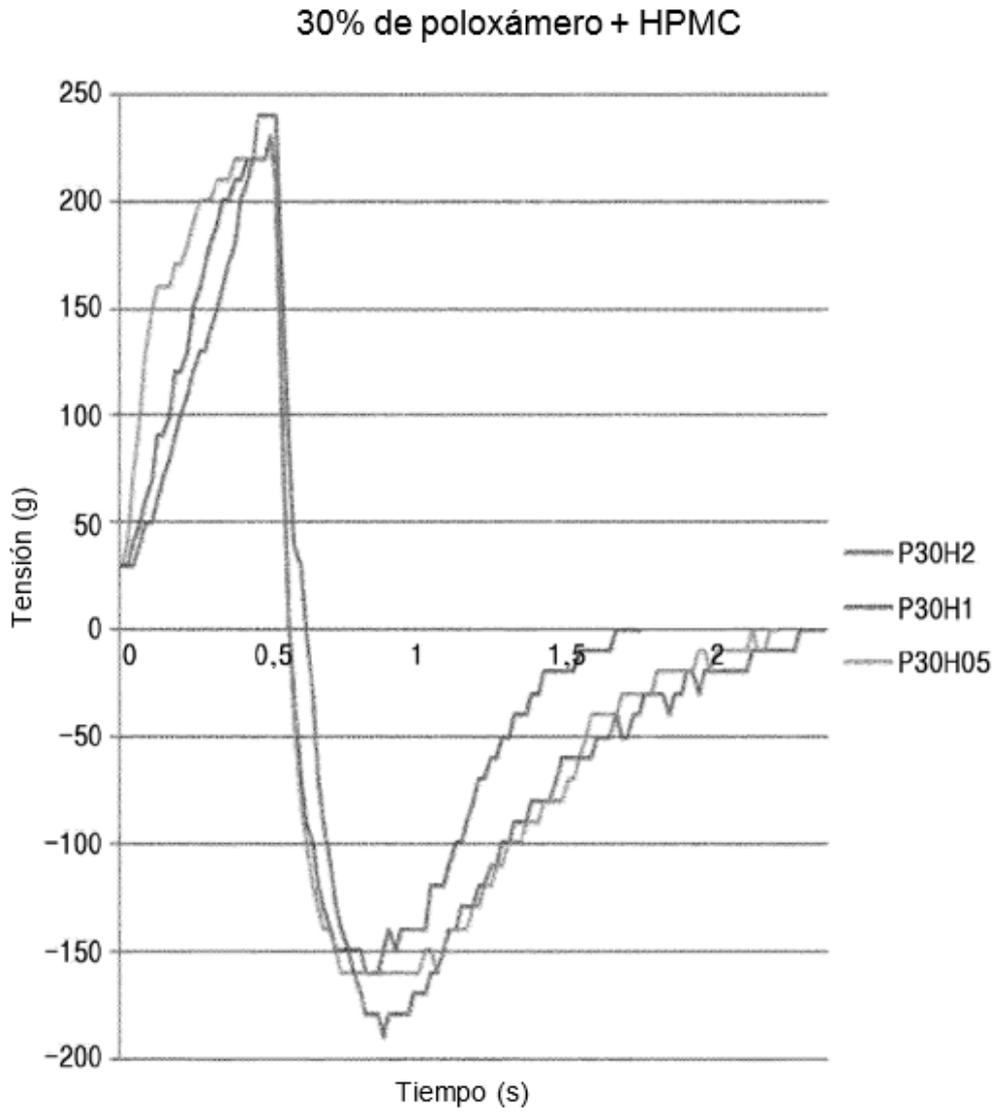


[Fig. 3a]

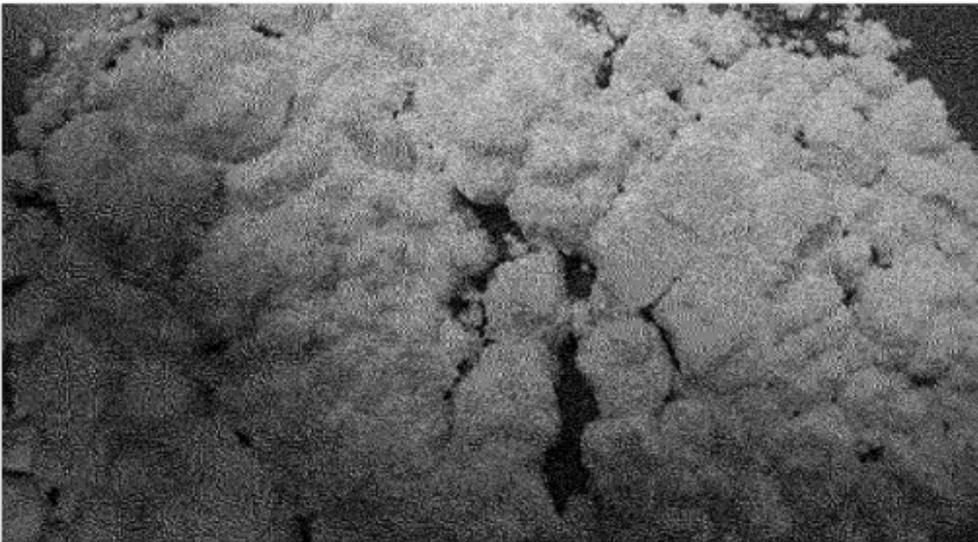
25 % de poloxámero + HPMC



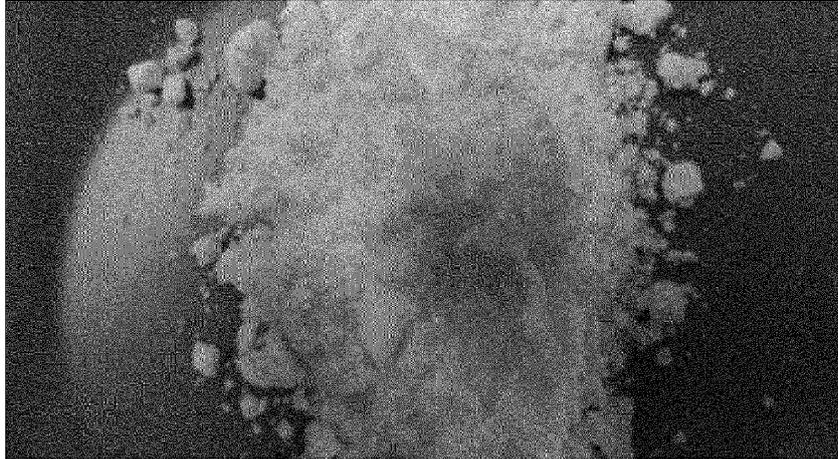
[Fig. 3b]



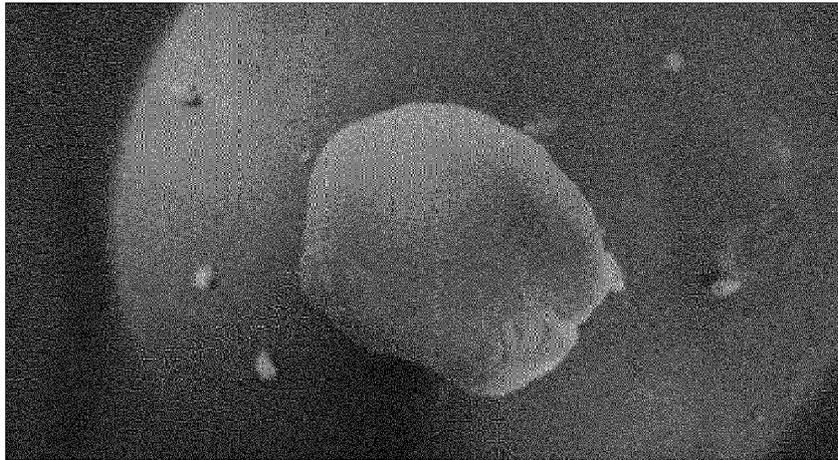
[Fig. 4a]



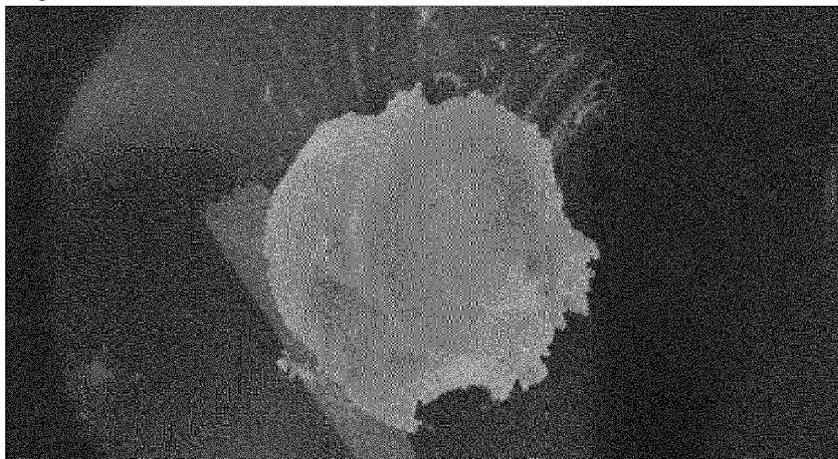
[Fig. 4b]



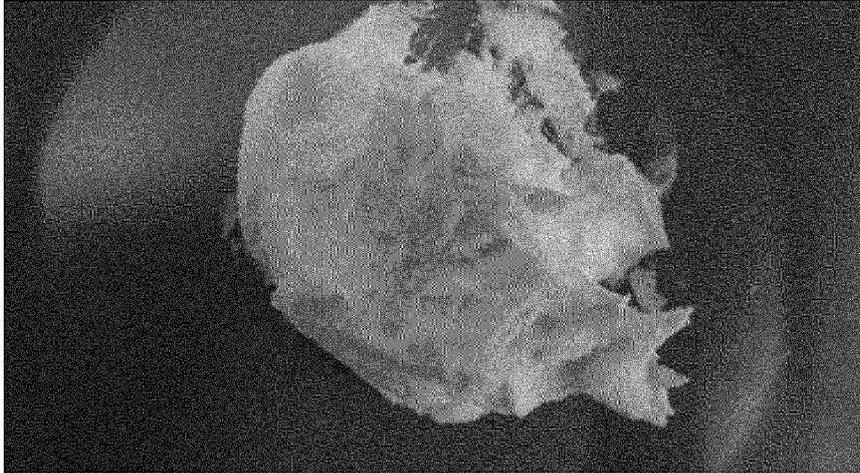
[Fig. 4c]



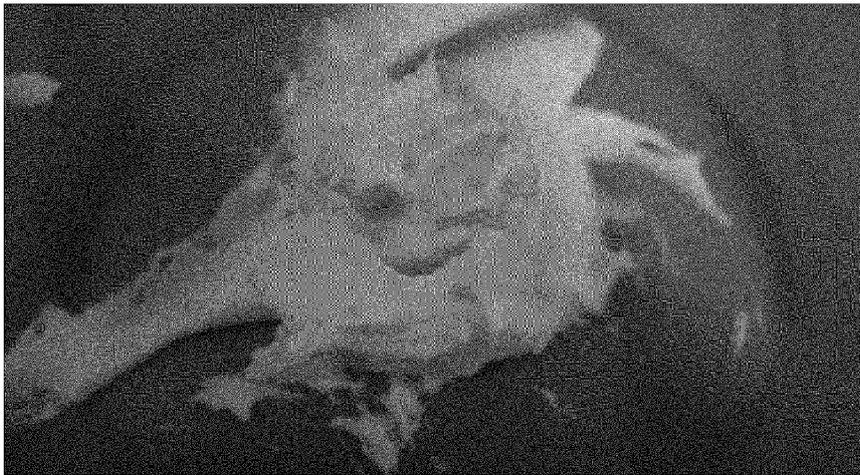
[Fig. 4d]



[Fig. 4e]

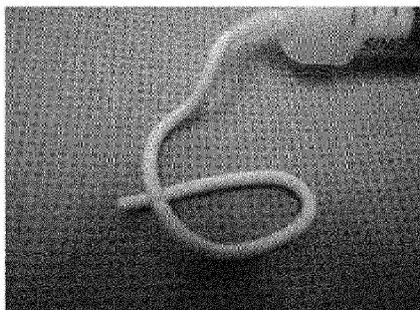


[Fig. 4f]

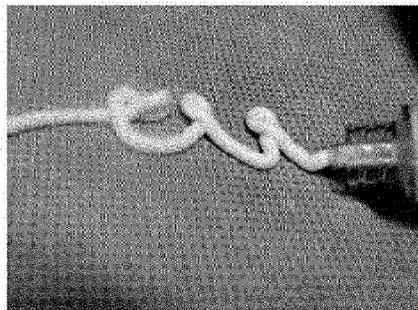


[Fig. 5]

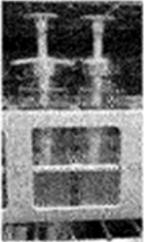
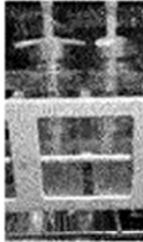
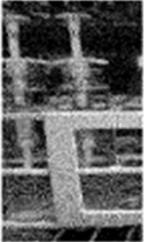
a)



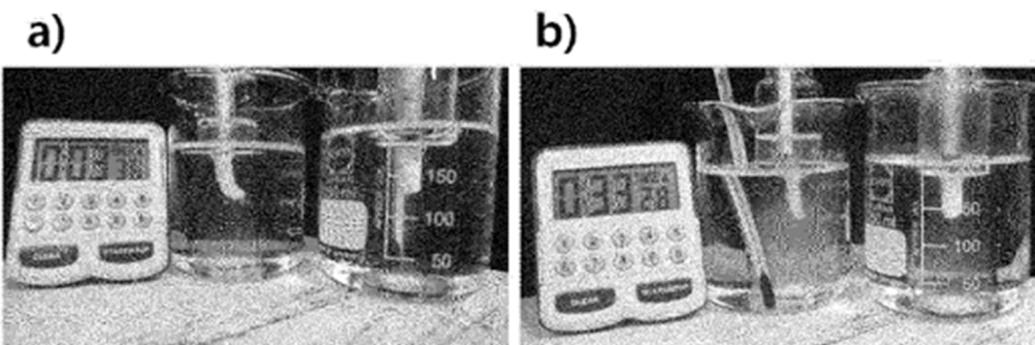
b)



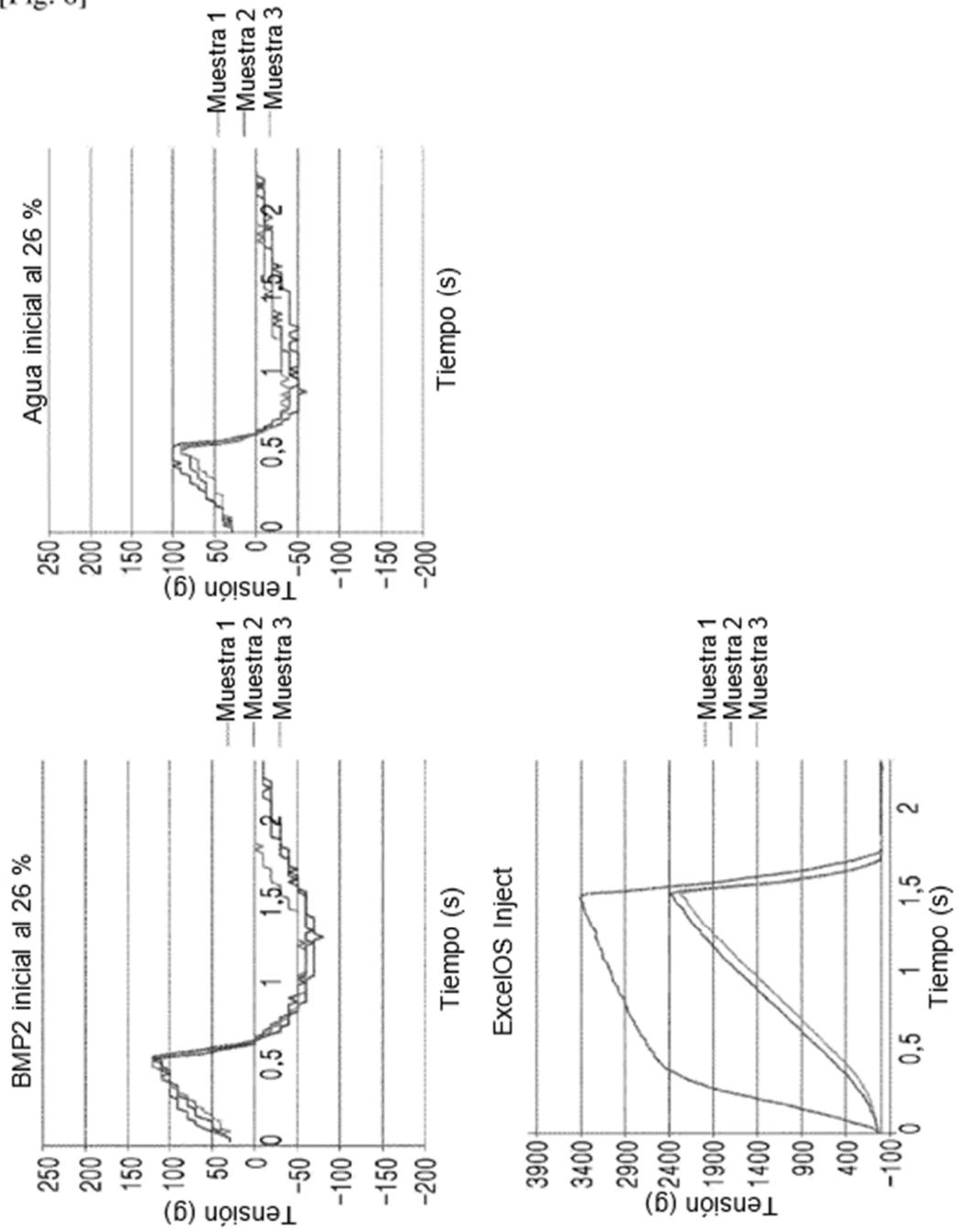
[Fig. 6]

	0 min	45 min	90 min
Ejemplo 1			
Ejemplo comparativo 1			

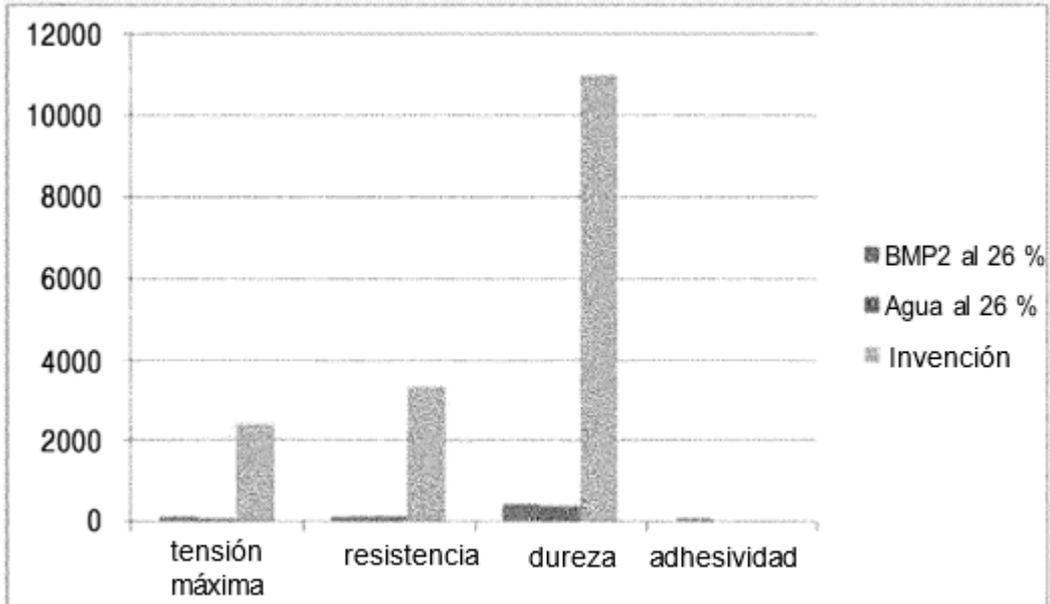
[Fig. 7]



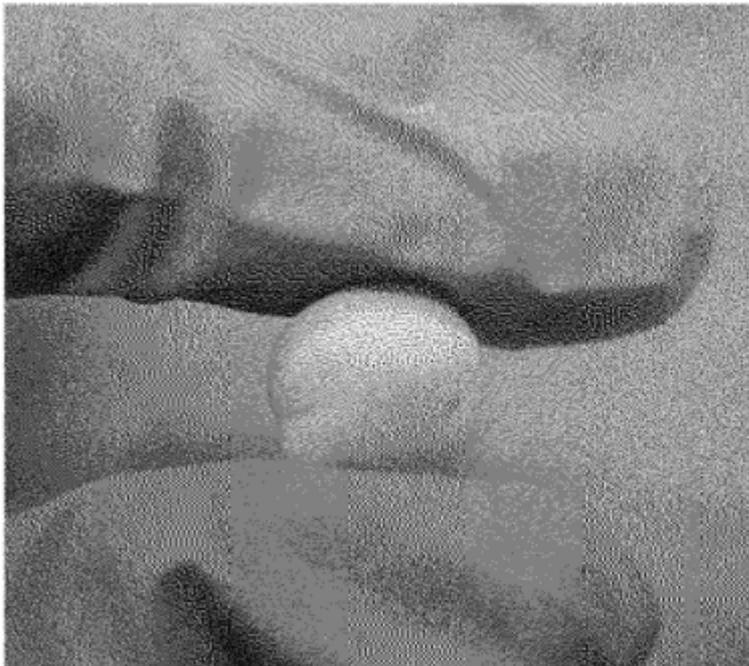
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

