



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

Organización y
Digitalización CSA Ltda

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

09-119370

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

COMPUESTOS DE ESTRONCIO QUE CONTIENEN COMPOSICIONES
DE FIBRINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BAXTER INTERNATIONAL INC. Y BAXTER HEALTHCARE S.A.

DOMICILIO

DEEFIELD, ILLINOIS, U.S.A. y GLATTPARK, OPFIKON, SUIZA, Resp.

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

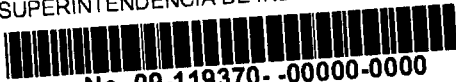
(FORMA P-10)

Podr, Cesar
23-11-2009



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-119370- -00000-0000

Fecha: 2009-10-23 16:55:20
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 108

ción

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BAXTER INTERNATIONAL INC.
Y BAXTER HEALTHCARE S.A.

Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América y Suiza,
respectivamente.

Dirección: One Baxter Parkway,
Deerfield,
Illinois 60015,
Estados Unidos de América

y

Thurgauerstrasse 130,
8152 Glattpark (Opfikon),
Suiza

Respectivamente

Domicilio: Deerfield,
Illinois,
Estados Unidos de América

y

Glattpark,
Opfikon,
Suiza

Respectivamente

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. John J. BARRY
Alxingergasse 31/3
A-1100 Vienna
Austria

3. Gerald ZIMMER
Kornbergsiedlung 2,
A-3364 Neuhofen/Ybbs,
Austria

2. Andreas GOESSIL
Peter-Jordan-Strasse 117-119/2/8
A-1180 Viena,
Austria

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/060720

Publicación Internacional No. WO 2008/131154 A3

Fecha: 18 de abril de 2008

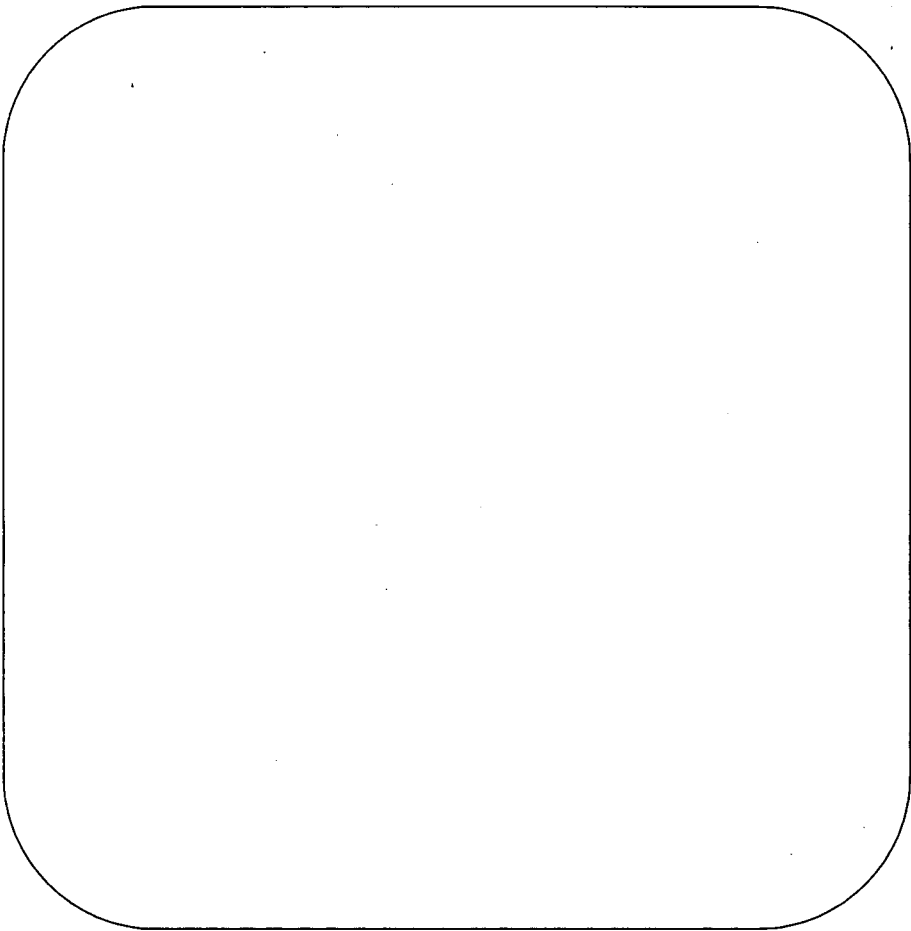
Fecha: 30 de octubre de 2008

6	Título (54) COMPUESTOS DE ESTRONCIO QUE CONTIENEN COMPOSICIONES DE FIBRINA									
7	Clasificación Internacional (51) <u>A61L 024/000</u> <i>A61L 27/22</i> <i>A61P 19/08</i>									
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>23 de abril de 2007</u>	(31) Número de Solicitud <u>60/925,716</u>						
9	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">Comprobante de pago No.: <u>09-72,593</u></td> <td style="width: 50%;">Fecha: <u>28 de septiembre de 2009</u></td> </tr> <tr> <td>Comprobante de pago No.: <u>09-72,646</u></td> <td>Fecha: <u>28 de septiembre de 2009</u></td> </tr> <tr> <td>Comprobante de pago No.: <u>09-78,660</u></td> <td>Fecha: <u>19 de octubre de 2009</u></td> </tr> </table>				Comprobante de pago No.: <u>09-72,593</u>	Fecha: <u>28 de septiembre de 2009</u>	Comprobante de pago No.: <u>09-72,646</u>	Fecha: <u>28 de septiembre de 2009</u>	Comprobante de pago No.: <u>09-78,660</u>	Fecha: <u>19 de octubre de 2009</u>
Comprobante de pago No.: <u>09-72,593</u>	Fecha: <u>28 de septiembre de 2009</u>									
Comprobante de pago No.: <u>09-72,646</u>	Fecha: <u>28 de septiembre de 2009</u>									
Comprobante de pago No.: <u>09-78,660</u>	Fecha: <u>19 de octubre de 2009</u>									
10	Anexos:									
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.00.									
☒	Comprobante de pago por 17 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por \$425.000.									
☐	Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.									
☐	Poderes, si fuere el caso.									
☐	Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.									
☐	Declaraciones.									
☒	Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)									
☒	Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)									
☐	Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.									
☐	Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.									
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.									
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.									
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.									
☐	Arte final 12x12									
☐	De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.									
☒	Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS									

30

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

FIRMA : Luz Clemencia Solórzano

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/131154 A3

Descripción:

Páginas 25 en el idioma original

Páginas 41 en español

Reivindicaciones: Número (s) 32

Figuras: Número (s) 14

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación de la inscripción del cambio de dirección del inventor
John J. BARRY.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
30 October 2008 (30.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/131154 A3

(51) International Patent Classification:

A61L 24/00 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2008/060720

(22) International Filing Date: 18 April 2008 (18.04.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/925,716 23 April 2007 (23.04.2007) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **BAXTER INTERNATIONAL INC.** [US/US]; One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015 (US). **BAXTER HEALTHCARE S.A.** [CH/CH]; Hertistrasse 2, CH-8304 Wallisellen (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BARRY, John, J.** [IE/AT]; Wagramer Strasse 190, A-1220 Vienna (AT). **GOESSL, Andreas** [AT/AT]; Peter-Jordan-Strasse 117-119/2/8, A-1180 Vienna (AT). **ZIMMER, Gerald** [AT/AT]; Kornbergsiedlung 2, A-3364 Neuhofen/Ybbs (AT).

(74) Agent: **MCMILLIAN, Nabeela, R.**; Howrey LLP, c/o Docketing Department, 2941 Fairview Park Drive, Suite 200, Falls Church, VA 22042-9922 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every

kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

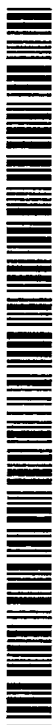
- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:

24 December 2008

(54) Title: FIBRIN COMPOSITIONS CONTAINING STRONTIUM COMPOUNDS

(57) Abstract: A composition for use in bone healing and bone regeneration in the form of a viscoelastic hydrogel gel or liquid formulation comprising fibrinogen, thrombin and an inorganic component comprising a strontium (Sr) containing compound and/or possibly another metal such as a calcium containing compound. The strontium containing compound can be dissolved in the thrombin solutions or added to the clot in crystalline particulate form. Upon mixing the components, gelation takes place to form a matrix. The composition may also comprise an iodine-containing compound which acts as a plasticizer.



WO 2008/131154 A3

FIBRIN COMPOSITIONS CONTAINING STRONTIUM COMPOUNDS

The present application claims the benefit of priority of U.S. Provisional Application No. 60/925,716, which was filed on April 23, 2007 and is specifically incorporated herein by reference in its entirety.

Field of the Invention

The present invention relates generally to a composition for use in bone healing and bone regeneration and specifically to a viscoelastic hydrogel gel or liquid formulation comprising fibrinogen, thrombin and an inorganic component comprising a compound containing strontium (Sr) containing compound and/or possibly another metal such as a calcium. The strontium-containing compound can be dissolved in the thrombin solutions or added to the composition in crystalline particulate form. Upon mixing the components, gelation takes place to form a matrix.

Background of the Invention

The current practice in bone healing and regeneration is to fill bone voids with either a bone graft (auto or allograft), a bone cement such as polymethylmethacrylate (PMMA) or injectable or implantable calcium salt void fillers. Autografts are the 'gold standard' choice for this application but there are issues with donor tissue limitations, trauma, infection and morbidity. There are a number of problems with allografts, including the risk of disease transmission and immunogenicity. Both auto and allografts display loss of biological and mechanical properties due to secondary remodeling. It is these limitations that have prompted interest in alternative materials to bone grafts (Parikh SN. 2002; J. Postgrad. Med. 48:142-148)

PMMA is a non-resorbable polymeric material. During its polymerization unreacted monomer, catalyst and low molecular weight oligomers become entrapped in the polymer. These chemicals have the potential to leach out of the material resulting in localised cytotoxic and immunological responses. PMMA polymerization has a high exotherm that can potentially cause heat necrosis. This exotherm also limits the ability of PMMA to incorporate any pharmacological or chemotherapeutic agents. PMMA leakage from a defect can result in very serious complications including compression of adjacent structures (requiring further surgery) and/or embolism.

7

Bone matrix at the nano-level (10^{-9} m) is composed of collagenous fibers in which tiny crystals of calcium salts are embedded. In order to simulate the natural make up of bone, calcium salts are frequently used to repair bone. There are a number of known calcium salt based "injectable void fillers." One major complication with calcium salt cements is their requirement for setting *in vivo* which is usually achieved by chemical reaction. Thus any biologics incorporated in the filler such as cells and pharmacological agents can potentially be damaged. Furthermore if the filler is too "fluid" it can leak out of the defect into adjacent spaces leading to compression of structures and possible emboli. Leakage from defects proximal to joints can potentially impair the joints function.

The calcium phosphate (CP) salt hydroxyapatite (HA structure $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) is closest to the mineral phase of bone and can easily be synthesized at the bench. It is also possible to prepare HA where other cations (for example, magnesium, sodium and strontium) or anions (chloride, fluoride and carbonate) are substituted into the crystal. Relating to the present invention is the substitution of calcium (Ca^{2+}) ions with strontium (Sr^{2+}) ions in the CP crystals. Strontium and calcium both belong to the alkaline earth elements, and resemble each other in that greater than 99% of the total calcium and strontium in the body is localized in bone. Strontium is the only element identified to have a positive relationship with bone strength, i.e., the mechanical strength of the bone increases with increasing strontium content. The potential therapeutic effects of strontium have been known for some time. However, it has been suggested in the literature that the therapeutic potential may have been overlooked due to confusion of normal, stable Sr^{2+} (^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr and ^{88}Sr) with its radioactive isotopes (^{85}Sr , $^{86\text{m}}\text{Sr}$, ^{87}Sr and ^{88}Sr) Dahl et al., Bone; 28 (4) pp. 446-453. Recently, the therapeutic effects of strontium have been highlighted, and research has demonstrated that strontium salts stimulate bone formation and inhibit bone resorption *in vitro* (even at low doses) and *in vivo*, as evaluated by bone histomorphometry in rodents and osteoporotic patients. Ferraro et al, 1983; Calcif Tissue Int. 35:258-60.

The powerful anabolic and antiresorptive effects of strontium has lead to the development of a new anti-osteoporotic drug. The orally active drug (active ingredient strontium ranelate) has been shown to reduce the risk of vertebral fractures and to increase bone mineral density. Meunier PJ et al, 2004; N Engl J Med. 350(5):459-68. The drug is composed of one molecule of ranelic acid bound to two atoms of strontium. The ranelate group was chosen as the carrier because it is tolerated well in the GI tract. In the gut the strontium ions are released from the ranelate group leading to absorption of the strontium by the gut mucosa. Upon absorption, the strontium exhibits strong affinity for bone tissue, and

becomes incorporated into the outermost hydrated layer of hydroxyapatite. A smaller amount integrates into the bone crystal, where the ratio of strontium over calcium atoms does not exceed 1:10, so that neither the formation nor the physicochemical properties of the crystal are altered by the presence of strontium. Strontium ranelate is suggested to be the first medication to uncouple bone formation from bone resorption. In vitro, strontium ranelate increases collagen and non-collagen protein synthesis, enhancing pre-osteoblast differentiation, inhibiting osteoclast differentiation, reducing osteoclast function and increases osteoclast apoptosis. In animal models, the increase in bone density is closely correlated with increases in biomechanical bone strength. In rat models, strontium ranelate increases bone mass and improves microarchitecture and bone geometry, resulting in increased bone resistance. In ovariectomized rats (a model for osteoporosis), strontium ranelate decreases bone resorption but maintains high bone formation. All the determinants of bone strength are positively influenced by strontium ranelate treatment (bone mass, dimension, microarchitecture, and intrinsic bone tissue quality). The increment in bone mechanical properties is characterized by an increase in maximal load but also by a dramatic improvement in energy to failure, which is essentially due to an increment in plastic energy. Kendler, 2006; Curr. Osteopor. Rep. 4(1):34-9; Marie, 2006; Curr. Opin. Rheum. 18 Suppl1:S11-5; Ammann, 2006, Bone. 38(2 Suppl 1):15-8. Although the mode of action of the strontium is not fully understood, the increase in osteogenesis is believed not to be associated with changes in circulating levels of 1,25(OH)₂ vitamin D or in parathyroid hormone effects. Strontium has been shown anti-fracture efficacy at all sites in a large number of post menopausal women. Close et al, 2006; Expert Opin Pharmacother 7(12):1603-15.

The localized application of strontium in the form of a strontium-containing bone cement has also been investigated by other researchers Wong, Chi-Tak, 2004, "Osteoconduction and osseointegration of a strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement : in vitro and in vivo investigations. Publisher: University of Hong Kong" (Pokfulam Road, Hong Kong); Zhao et al, 2004; J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 69(1):79-86. The nonresorbing Sr-HA bone cement was composed mainly of strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) filler and bisphenol A diglycidylether dimethacrylate (BIS-GMA) resin. It was proposed that the material could be used for vertebroplasty as it could be delivered by injection and had better physico/mechanical properties than PMMA. The strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) bone cement was demonstrated to be bioactive both in vitro and in vivo. In-vitro it appeared to be more efficacious than a non-

9

doped hydroxypatite (HA) bone cement for cell attachment (SaOS-2) and bone mineralization. In-vivo the Sr-HA bone cement bonded with natural bone.

In U.S. Patent Nos. 5,736,132 and 5,549,904, both of which are hereby incorporated by reference, a transglutaminase supplemented adhesive tissue adhesive is said to preferably
5 contain a divalent metal ion such as calcium and strontium in an amount in the range of about 0.5 mM to about 100 mM at a pH of about 7.0 to about 8.5. It is claimed that the transglutaminase supplemented adhesive can be used in the treatment of tissue in joint fractures, chondral defects, superficial chondral defects, full-thickness defects, osteochondritis
10 dissecans, meniscal tears, ligament tears, tendon tears, muscle lesions, myotendinous junction lesions, cartilage transplantation, bone transplantation, ligament transplantation, tendon transplantation, chondral transplantation, chondroosseous transplantation, skin graft fixation and blood vessels, patching vascular grafts and microvascular blood vessel anastomosis. The primary focus of the patents is the incorporation of the transglutaminase in an adhesive.

In contrast, the present invention does not incorporate transglutaminase and is
15 intended for injection into osseous defects or voids for local delivery of strontium and to aid in the formation of new bone. Literature data shows that elemental strontium is able to stimulate bone formation while simultaneously inhibiting bone resorption.

Summary of the Invention

20

The present invention provides a composition that may be injected into an osseous defect or void or into the marrow space of trabecular bone tissue where it temporarily replaces bone marrow, to aid in the formation of new bone. The data shows that elemental strontium is able to stimulate bone formation while simultaneously inhibiting bone resorption.

25

In one aspect, the invention provides a composition for use in bone healing and bone growth wherein the composition comprises fibrin, thrombin and a strontium-containing compound. The composition may further comprise a calcium-containing compound. Preferably, the composition is an injectable composition that is in the form of an injectable gel, n injectable putty, injectable paste or injectable liquid form.

30

In other embodiments, the composition may comprise one or more plasticizer agents. In certain embodiments, the plasticizer is an iodine-containing compound. Exemplary iodine-containing compound for use as plasticizers herein include but are not limited to compounds selected from the group consisting of diatrizoate, iodecol, iodixanol, iofratol, iogulamide, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopromide, iotrol, ioversol, ioxagulate and metrizamide and
35 mixtures thereof and polyvalent alcohols. In other embodiments, the plasticizer is a

polyethylene glycol, a polyvalent alcohol, glycerol, or sugar selected from the group consisting of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, polysaccharides, and combinations thereof. In other embodiments, the plasticizing effect is achieved by the adjustment of the composition of low molecular weight compounds such as, among others,
5 sodium chloride and chaotropic agents.

The composition may be in a gel or a liquid form. In certain aspects, the composition can be delivered as a liquid or a gel prior to or during the gelling phase or as a pre-formed gel into tissue defects.

In other aspects of the invention the composition contains one or more extra-cellular
10 protein selected from the group consisting of matrix proteins such as fibronectin, cellular associated proteins or plasma derived proteins such as blood clotting factor XIII and proteases.

In still other embodiments, the composition may further comprise a clotting inducing agent such as protamine, snake venom, transglutaminases, FXIIa, or a physiologically
15 acceptable alkaline buffer system.

In specific embodiments, the composition is such that the composition is resorbed and replaced with tissue during the healing process.

The strontium containing compound used in the compositions of the invention may be one selected from the group consisting of strontium chloride, strontium ranelate, strontium
20 acetate, strontium glutamate, strontium aspartate, strontium malonate, strontium maleate, strontium ascorbate, strontium threonate, strontium lactate, strontium phosphate, strontium apatites, strontium pyruvate, strontium alpha-ketoglutarate and strontium succinate. These are merely exemplary strontium-containing compounds and other compounds that contain strontium may readily be employed in the compositions of the present invention.

25 The composition may be one which further comprises a strontium co-ligand selected from the group consisting of groups calcimimetics, osteocalcin, amino acids such as L-arginine, and, arginomimetics and arginine analogs.

In the compositions described herein, the strontium-containing compound and/or the calcium-containing compound may be in a (micro)particulate or solid form. In exemplary
30 embodiments, the strontium-containing or calcium-containing (micro)particulate form has a particle diameter size ranging from 100 nanometers – 500 μm . In other embodiments, the strontium containing or calcium containing components can take the form of porous or non-porous solids with dimensions ranging from, for example 0.5 to 50 millimeters. Preferably, the particle size is in the range of 0.5 to 5 millimeters.

In specific embodiments, the calcium-containing compound is a calcium phosphate. The calcium phosphate may be selected from the group consisting of tricalcium phosphate, alpha-tricalcium phosphate, beta-tricalcium phosphate, polymorphs of calcium phosphate, hydroxyapatite, calcium carbonate, calcium sulfate and combinations thereof.

5 In certain embodiments, it is contemplated that some of the calcium is substituted with strontium to provide a mixture of calcium and strontium salts.

In specific embodiments, the ratio or percentage of strontium salts to calcium salts ranges from .25% to 100%. In certain embodiments, the compositions of the invention may further comprise a protein or combination of proteins selected from the group consisting of
10 bone morphogenic proteins, parathyroid hormone (PTH), calcitonin, bisphosphonates, epidermal growth factor, insulin like growth factors and TGF growth factors. Any proteins that have a bone growth promoting, or bone augmenting effect may be used. In still other embodiments, the strontium-containing compound is made by adding strontium into a bioactive glass to produce a strontium-containing bioactive glass material.

15 In certain other embodiments, the composition is one in which gelation of the composition occurs upon mixing of the various components.

In preferred embodiments, the methods of the invention comprise treating diseased, injured or deficient bone in a living subject by injecting into the cancellous bone of said subject a composition comprising a strontium-containing composition of the present
20 invention. Advantageously, the injection of such a composition into the cancellous bone of the subject causes a rate of healing that is faster than observed with the application of a similar composition that does not contain strontium.

Also contemplated herein is a method of repairing a bone having a defect comprising: (a) mechanically fixing the bone or portions thereof; and (b) filling the defect with a
25 composition of the invention in an amount effect cause repair of said defect. In exemplary embodiments, the defect is a bone fracture and said repair is bone healing of said fracture. In specific aspects of the invention, the application of said composition causes a rate of healing that is faster than observed in the absence of application of said composition. Preferably, the application of said composition causes a rate of healing that is faster than observed with the
30 application of a similar composition that does not contain strontium.

Also contemplated is a method of promoting new bone growth at the site of a bone defect comprising contacting said site of defect with a composition of invention. Preferably the rate of said bone growth is faster in the presence of strontium in said composition as

compared to bone growth seen in the presence of a similar composition that does not contain strontium.

Brief Description of the Drawings

5

Fig. 1 shows cell proliferation for human osteoblast-like cells (SaOS-2) grown on clots containing strontium. The notation used is Ca/Sr. The values quoted are the concentrations in the final clot. To achieve these concentrations in the final clot, the concentration in the buffer is doubled.

10

Fig. 2 shows a DNA assay for human osteoblast-like cells (SaOS-2) grown on clots containing strontium. The notation used is Ca/Sr. The values quoted are the concentrations in the buffer. This value is halved in the final clot.

15

Fig. 3 shows alkaline phosphatase production over 30 minutes for human osteoblast-like cells (SaOS-2) grown on clots containing strontium. The values quoted are the concentrations in the final clot. To achieve this the concentration in the buffer is doubled.

Fig. 4 shows turbidimetric analysis of clots for where the thrombin buffer is comprised of either a calcium, a calcium/strontium mix or strontium alone. The notation used is Ca/Sr. The values quoted are the concentrations in the buffer. This value is halved in the final clot.

20

Fig. 5 shows percentage survival (as measured by MTS proliferation assay) for clots grown in media containing 12.5mM Sr or Ca.

Fig. 6 shows staining of NHOst cells cultured on fibrin clots and fibrin clots containing strontium particles., Live (left panel) Dead (right panel) staining of NHOst cells cultured on fibrin clots for 14 days (Top panel) or fibrin clots containing strontium particles (Bottom panel).

25

Fig. 7 shows transverse sections of fibrin clots cultured with NHOst cells. Cells stain green (Live) and red (Dead). Top fibrin clot. Bottom fibrin clots containing particles.

Fig. 8 shows a graphical representation of completely closed drill holes (both sides are closed).

30

Fig. 9 shows the μ CT of a rabbit femoral condyle in the presence of fibrin in the material.

Fig. 10 shows graphical representation of bone formation (evaluation: 1: low; 2: medium; 3: high bone formation).

Fig. 11 shows μ CT of a rabbit femoral condyle with 80% Sr material.

Fig. 12 shows a histological stained thin section of a rabbit femoral condyle defect treated with Fibrin.

35

Fig. 13 shows a histological stained thin section of a rabbit femoral condyle defect treated with Sr 80% in a fibrin clot.

Fig. 14 shows the Influence of SrCl_2 on bioactivity of PTH.

5 Detailed description of the invention

10 The present invention is directed to a thrombin, fibrin composition and/or strontium in an insoluble or soluble form and/or an inorganic particulate which may or may not contain strontium and/or a fibrin plasticizer for use in bone healing and bone regeneration. Alteration of the amounts of either the thrombin, or the inorganic particulate content, allows for control of the gelation period as the application or the target tissue dictate. A fibrin plasticizer or modifying agent can be used to enhance the mechanical properties of the formulation or to further delay the clotting time. Examples of plasticizers include iodine containing contrast agents such as diatrizoate, iodecol, iodixanol, iofratol, iogulamide, iohexol, iomeprol, 15 iopamidol, iopromide, iotrol, ioversol, ioxagulate and metrizamide and mixtures thereof and polyvalent alcohols.

The composition can be delivered as a liquid prior to or during the gelling phase or as a pre-formed gel into tissue defects using a minimally invasive technique. It is intended that the formulation is resorbed and replaced with tissue during the healing process.

20 The fibrinogen solution is an aqueous solution with fibrinogen ranging from 5-200 mg/ml, preferably in the range 50-100 mg/ml. The fibrinogen solution can also include extra-cellular matrix proteins (e.g., fibronectin, cellular associated proteins, other plasma derived proteins [e.g., blood clotting factor XIII and proteases]. The fibrinogen solution can also include fibrin monomer, derivatives and fibrin I.

25 The thrombin component, may further comprise additional compounds known in the art as well as the strontium compound. There is no specific limitation in respect to the amount of thrombin used. In one example of the present invention, the amount of thrombin in said thrombin component (b) is such that it is at least about 1 IU/ml in the final clotted composition up to the amount of 30 IU/ml.

30 In place of or in addition to thrombin the present invention other gelation inducing or clotting inducing agent for component (a), such as protamine, snake venom, transglutaminases, FXIIa, a physiologically acceptable alkaline buffer system.

The thrombin buffer is an aqueous solution containing among other substances a divalent cation. The concentration of divalent cation in the buffer can range from 5-50 mM. 35 Preferably the divalent cations are chosen from the groups calcium and strontium and the ratio

can be from 0:1 to 0.975:0.025 . The divalent strontium ions can be added in the form of strontium chloride or any other water soluble strontium salt such as strontium ranelate, strontium glutamate, strontium aspartate, strontium malonate, strontium maleate, strontium ascorbate, strontium threonate, strontium lactate, strontium pyruvate, strontium alpha-ketoglutarate or strontium succinate. The thrombin buffer can also contain co-ligands for a newly identified molecular target of strontium (a G-protein-coupled receptor calcium-sensing receptor, Pi et al., J. Biol. Chem. 2005). Co-ligands are selected from the groups calcimimetics, osteocalcin and amino acids. Preferably L-arginine, arginomimetics or arginine analogs. The strontium containing thrombin buffer can also be used in conjunction with the strontium containing inorganic particles.

The particulate component has a particle size diameter in the range of nano to less than 3000 μm . and should be insoluble at the time of application. Preferably, the particle size is between 100 nanometers to 50 millimeters and more preferably between 0.5mm to 50 mm. The particles can be any chelate of strontium which is insoluble at the time of application or strontium substituted calcium salts which are also insoluble at the time of application. The calcium salt for substitution can be selected from the group consisting of calcium phosphates, tricalcium phosphates, alpha-tricalcium phosphate, beta-tricalcium phosphate, polymorphs of calcium phosphate, hydroxyapatite, calcium carbonate, calcium sulfate and combinations thereof. The strontium substitution of calcium of the particles can range from 0.25-100 %. Mixing to obtain the final gel can be achieved over a range of temperatures 18-37 $^{\circ}\text{C}$, preferably 37 $^{\circ}\text{C}$.

The fibrinogen solution is an aqueous solution with fibrinogen ranging from 5-200 mg/ml, preferably in the range 50-100 mg/ml. The fibrinogen solution can also include fibrin monomer, derivatives and fibrin I. The fibrinogen solution can also include extra-cellular matrix proteins, e.g. fibronectin, cellular associated proteins, and other plasma derived proteins such as blood clotting factor XIII (FXIII) and proteases.

The thrombin solution is an aqueous solution with a minimum final concentration of 0.1 IU/ml in the final clotted (or gelled) composition. This solution can also be buffered and contain amino acids, proteins or additives (for example L-arginine, mannitol and albumin).

The thrombin buffer is an aqueous solution containing among other substances a divalent cation. The concentration of divalent cation in the buffer can range from 5-50 mM. Preferably the divalent cations are chosen from the groups calcium and strontium and the molar ratio (can be from 1:0 to 0.975:0.025 of calcium to strontium).

The particles can be any chelate of strontium which is insoluble at the time of application or strontium substituted calcium salts which are also insoluble at the time of application. The calcium salt for substitution can be calcium phosphates, tricalcium phosphates, alpha-tricalcium phosphate, beta-tricalcium phosphate, a polymorph of calcium phosphate, hydroxyapatite, calcium carbonate, calcium sulfate and combinations thereof. The strontium substitution of the particles can range from 0.25-100 % as a ratio of the substituted particles.

The particle content in the composition ranges from 2-100 % preferably 30-50 % (weight/volume) of clottable proteins. The particulate component has a particle size diameter in the range of sub-micron to less than 3000 μm , as the application requires. Homogenisation to obtain the final gel can be achieved over a range of temperatures 18-37 $^{\circ}\text{C}$, preferably 37 $^{\circ}\text{C}$.

The efficacy of the compositions of the present invention to aid in bone repair can be further improved by incorporating bioactive molecules. These can be chemically attached to the matrix, adsorbed on particulate component or trapped in the fibrin matrix either as a free molecule or as a drug powder. These molecules can be used to stimulate bone metabolism (anabolism and or catabolism). Suitable molecules that have been identified include bone morphogenic proteins (BMP), parathyroid hormone (PTH), calcitonin, bisphosphonates, epidermal growth factor, insulin like growth factors and the TGF super family growth factors. Suitable molecules can also include other factors not related to the bone anabolism/catabolism cycle but relating to physiological processes that occur in parallel to bone repair/ remodeling such as angiogenic stimulators (vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet derived growth factors [PDGFs] can also be incorporated. This is of particular interest as the mode of action of the strontium is believed to be separate from the anabolic agents 1,25(OH)₂ vitamin D and parathyroid.

A plasticizer can also be mixed with the fibrin or thrombin to enhance the mechanical properties of the formulation or to further delay the clotting time. Examples of plasticizers are selected from the group consisting of water-soluble iodine containing contrast agents, polyethylene glycols, polyvalent alcohols such as glycerol, mono-, di-, tri- and polysaccharides, and any combination thereof. Suitable iodine containing contrast media are detailed in U.S. patent application number US 20050119746 (Lidgren and Nilson, 2004), which is hereby incorporated by reference, examples of which are diatrizoate (meglumine), iodecol, iodixanol, iofratol, iogulamide, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopromide, iotrol,

ioversol, ioxaglate and metrizamide. Preferably the contrast agent is non-ionic, has a low osmolality and allows fibrin assembly to occur for example iodixanol.

The compositions of the present invention may be used in useful bone healing methods and in kits for use in such methods. It is contemplated that the composition may be used for promoting bone growth or healing especially in long bones. Specifically, the present invention relates to a bone repair composition that contains thrombin, fibrin and strontium. The presence of strontium in the composition leads to enhanced bone healing and or bone generation as compared to such a composition that does not contain strontium.

The compositions of the invention may be used in repairing and regenerating long bones such as the femur, tibia, humerus, radius ulna and the like.

Using the compositions of the present invention it will be possible to restore or partially restore mechanical, architectural and structural competence to bones having defects, while providing structural surface areas, which can serve as appropriate substrates for the biological process governing bone healing and regeneration.

As shown in the examples, the composition of the invention accelerates the cellular and biological processes involved in bone repair.

As used hereinafter the phrase "long bone" refers to a bone having a length, which is at least two times longer than the diameter. Typically, the phrase "long bone" refers to the bones of the extremities, i.e. the tibia, fibula, femur, humerus, radius, ulna, carpals, metacarpals, phalanges, tarsals and metatarsals. More specifically, the phrase "long bone", as used herein, refers to the four main bones of extremities, i.e., the tibia, the femur, the humerus and the radius.

The "bone defect" that may be remedied by use of the compositions of the present invention may be any abnormality in the bone, including, but not limited to, a void, a cavity, a conformational discontinuity, a fracture or any structural change produced by injury, osteotomy, surgery, fractures, malformed healing, non-union fractures, skeletal deformations, aging, or disease. The compositions of the present invention provide significant therapeutic potential. When cancellous bone becomes diseased, for example, because of osteoporosis, avascular necrosis, or cancer, the surrounding cortical bone becomes more prone to compression fracture or collapse. This is because the cancellous bone no longer provides interior support for the surrounding cortical bone. The compositions of the invention can be used in strengthening bone in conditions such as osteoporosis, osteonecrosis or avascular necrosis as well as other bone disease involving infected bone, poorly healing bone, or bone fractured by severe trauma.

Another aspect of the invention provides a kit for repairing a bone having a defect. The kit includes a mechanical fixing device for fixing the bone or portions thereof and compositions of the present invention. Examples of a fixing device include, but are not limited to, flanges, rods, bars, wires, staples, screws, sutures as well as various casts, sleeves and the like, which are typically external fixing devices. Hence, the kit of the present invention preferably includes an external mechanical fixing device.

Another aspect of the present invention there is provided a method of treating bone defects, such as fractures, cavities voids and the like comprising contact them with a composition of the present invention. In some embodiments, the method may involve mechanically fixing the bone or portions thereof prior to, or following a step of contacting the defect with a composition of the present invention.

Advantageously, the compositions of the present invention may be used as injectable compositions that are delivered into an osseous (bone) defect or void or into the marrow space of trabecular bone tissue where the composition temporarily replaces bone marrow, and/or aids in the formation of new bone. The compositions may be injected into trabecular bone tissue or any other bone tissue using techniques well known to those of skill in the art. Exemplary such techniques and apparatus for performing such techniques are discussed in for example, U.S. Patent publication No. 20080065091, U.S. Patent publication No. 20080058828, U.S. Patent publication No. 20070073307, U.S. Patent Nos. 4,969,888 and 5,108,404 among others (each of these patent documents are incorporated herein by reference). Typically, injection devices similar to a household caulking gun are used to inject the compositions into bone. A typical bone cement injection device has a pistol shaped body, which supports a cartridge containing bone cement. A trigger actuates a spring-loaded ram, which forces a volume of bone cement in a viscous condition through a suitable nozzle and into the interior of a bone targeted for treatment. According to the teachings of U.S. Patent Nos. 4,969,888 and 5,108,404, a cavity can be first formed by compacting cancellous bone inside the bone, into which the bone cement is injected.

An added advantage of incorporation of the Sr into the injectable compositions of the invention is that it allows the delivery and healing process to be monitored using a technique such as fluoroscopy due to the known properties of strontium as a radio-opacifier. As such, the use of the Sr in the compositions of the present invention provides both a therapeutic and diagnostic function and not simply an imaging function alone.

The compositions of the present invention may be used in the form of an injectable gel, an injectable paste, a paste, a putty, or a rehydratable freeze-dried form. As used herein,

the term "gel" refers to a jelly-like, thick, soft, partly liquid substance. A gel of the present invention may be extruded through at least a 13 gauge syringe needle. "Paste," as used in the present application refers to a soft, moist, substance having a consistency between a liquid and a solid. A paste of the present invention is less solid than a putty and more solid
5 that a gel, and in some embodiments may be injectable.

The term "putty" refers to a dough-like/clay-like tissue repair composition of the present invention. During application the substance may be beaten or kneaded to the consistency of dough, and molded into a shape closely approximating that of the implant site.

"Injectable" refers to the ability of the present invention to be introduced at an implant
10 site under pressure (as by introduction using a syringe). An injectable composition of the present invention may, for example, be introduced between elements or into a confined space in vivo (i.e., between pieces of bone or into the interface between a prosthetic device and bone, among others).

"Syringe" refers to any device that may be used to inject or withdraw flowable tissue
15 repair compositions of the present invention, including certain gels and pastes, among others.

The composition is injected into cortical bone or trabecular bone of a subject (preferably, the subject is a human, simian, ovine, bovine, equine, porcine subject). "cortical bone," as used in the present application, refers to the compact bone of the shaft of a bone that surrounds the medullary cavity. Cortical bone is a highly dense structure made up of triple
20 helix strands of collagen fiber, reinforced with hydroxyapatite. The cortical bone is a compound structure and is the primary load bearing component of long bones in the human body. The hydroxyapatite component is responsible for the high compressive strength of the bone while the collagen fiber component contributes in part to torsional and tensile strength. The compositions of the invention may be introduced into such bone parts to impart a
25 beneficial bone healing or bone augmentation effect.

Trabecular bone is of similar composition to cortical bone and is the primary structural component of "cancellous bone" and refers to adult bone consisting of mineralized regularly ordered parallel collagen fibers organized differently than in the lamellar bone of the shaft of adult long bones. Cancellous bone is generally found in the end of long bones surrounded by
30 cortical bone. Cancellous bone has spicules that form a latticework, with interstices filled with bone marrow. It may also be referred to as a trabecular bone, or spongy bone. In preferred embodiments, the compositions of the invention are delivered into trabecular bone.

The bone-fixing methods of the invention also may include the step of reshaping the defect prior to bone fixing or contacting with the composition of the invention. Such

reshaping or bone realigning can be performed with, for example, drills or grinders or any other device utilizable for reshaping the defect.

The device used for fixing the bone will depend on the type of defect to be repaired and on the type and placement of the bone. Typically, the fixing device is an external fixing device. Preferably, an external fixing device such as, for example, a cast, is the only fixing
5 device utilized in the method of the present invention, accompanied with an injection of the composition of the present invention. However, in some circumstances it may be necessary to employ more invasive surgical procedures using an internal fixing device can be utilized as well.

10 Repair can be monitored and in due course the device employed to fix the bone may be removed. Bone regeneration at the site of the defect can be assessed by soft tissue X-rays (7.5 mA; 0.5 sec) taken immediately following surgery and at given time intervals post surgery. Bone regeneration in test animals also can be determined upon termination of the experiments by assessing general morphology, computerized topography (CT) scan (65-80
15 kV; 20 sec) and three-dimensional (3-D) CT scan (Marconi, M.times.8,000). Histological studies can be performed to determine the bone staining of the tissue.

In the methods of the invention, the compositions also may be combined with cells that can be used in bone repair, such as for example, osteoprogenitor cells. Osteoprogenitor cells, as is known in the art, include an osteogenic subpopulation of the marrow stromal cells, characterized as bone forming cells. The osteoprogenitor cells utilized by the method of the
20 present invention can include osteogenic bone forming cells per se and/or embryonic stem cells that form osteoprogenitor cells. The osteoprogenitor cells can be isolated using known procedures. Such cells are preferably of an autological source and include, for example, human embryonic stem cells, murine or human osteoprogenitor cells, murine or human
25 osteoprogenitor marrow-derived cells, murine or human osteoprogenitor embryonic-derived cells and murine or human embryonic cells. These cells can further serve as cells secreting growth factors, as described by Robinson and Nevo (2001), which are defined hereinabove.

The composition of the present invention also may further comprise various active therapeutic agents, which can include bone growth-promoting agents, osteoprogenitor cells or
30 a combination thereof. The compositions may include at least one drug, such as, a vitamin, an antibiotic, an anti-inflammatory agent and the like.

In certain preferred embodiments, the strontium is incorporated into a calcium containing salt using techniques known to those of skill in the art to prepare strontium substituted calcium compounds. In addition, strontium may be incorporated into bioactive

5 glasses which are conventionally used in tissue repair. A “bioactive glass” is any glass that displays characteristics of bioactivity, it is typically and an amorphous solid that is not intrinsically adhesive and that is capable of forming a cohesive bond with both hard and soft tissue when exposed to appropriate in vivo and in vitro environments, such as simulated body fluid or tris-hydroxymethylaminomethane buffers. A cohesive bond is achieved by developing a surface layer of hydroxycarbonate apatite onto the bioactive glass through the release of ionic species from the bulk bioglass material. There are numerous applications for bioactive glasses in the field of surgical and orthopedic treatments as well as in dental surgery and have been described, for example, in European Patent 1 405 647 and European Patent Application 10 1 655 042, as well as in International applications WO 96/21628, WO 91/17777, WO 91/12032 and U.S. Patent publication number 20080066495 (each incorporated herein by reference).

Examples:

15 In one embodiment of the invention, the strontium-containing compound is used as the divalent ion in a thrombin dilution buffer. The thrombin solution is prepared using the dilution buffer. The fibrinogen solution and the strontium containing thrombin solution are mixed to form a gel.

20 In another embodiment of the invention, the strontium-containing compound is added to the formulation as a salt particle. The thrombin solution and particles are mixed to prepare the modified thrombin solution. The fibrinogen solution and the modified thrombin solution are mixed to form a gel.

25 **Example I: Strontium Containing Compound Dissolved in the Buffer Solution.**

A series of buffers were prepared in double distilled water. For these buffers, the divalent cation in the thrombin buffer was Ca or a Ca + Sr mixture such that the cation concentration was kept constant at 40 mM (see table below for strontium chloride). The thrombin was diluted to a concentration of 4IU in the thrombin buffer.

30

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

The fibrinogen was then mixed with thrombin in a 1:1 ratio (therefore the strontium concentration in the gelled clot is halved). For this, 2 ml of the thrombin solution can be transferred to a 5ml syringe. 2 ml of fibrinogen (Tisseel, Baxter, Clottable Protein, [fibrinogen and fibronectin] 72-110 mg/ml) was transferred to a separate 5ml syringe. The
5 syringes containing the fibrinogen and the thrombin can be connected to any state of the art mixer for the purpose of combining.

For *in-vitro* experiments, the clots were prepared by pipetting 150 μ l of the fibrinogen solution to the wells of a 24 well plate. The plate was put on plate shaker to ensure an even distribution over the well bottom. 150 μ l of the thrombin solution was then added to the well
10 and the plate was put on a plate shaker to ensure homogeneous clots. A human osteoblast-like cell line (SaoS-2) was cultured on the clots for up to 7 days to see if any differences in cell proliferation/cell differentiation could be observed. Figure 1 shows the results for proliferation (Alamar Blue) when Strontium Chloride (SrCl_2) is added to the thrombin dilution buffer. Similar results are available for Strontium Acetate (SrAc).

15 The Alamar Blue assay is a metabolic assay and is often used to measure proliferation. The addition of strontium resulted in significant increased proliferation on these clots when compared to a normal clot with 20mM CaCl_2 . A similar result was also observed when the proliferation was quantified using a DNA stain (Figure 2). After 7days, clear differences could be observed between cells grown on clots containing either a calcium strontium mix or
20 only calcium. Thus we conclude that strontium has a positive effect on the proliferation of osteoblast like SaOS-2 cells.

These initial experiments were designed to look at differences in cell proliferation did not provide sufficient time to investigate osteoblast differentiation. The enzyme alkaline phosphatase is an early indicator of differentiation but levels do not really peak till about days
25 10-14. A preliminary result shows an increase in alkaline phosphatase expression in the clots containing strontium (Fig. 3). In the case of strontium acetate these values appear not to be significant. These experiments are being repeated with a 14 day investigative period.

In addition to the cell studies observation, turbidmetric analysis was carried out to examine if the clot structure was altered as a result of the strontium (Figure 4) The clot
30 turbidity is directly proportional to average cross-sectional area of the fibres, therefore the more turbid the clot the greater the fiber diameter.

The turbidimetry data in Fig. 4 shows that there is very little difference in the kinetics and absorbance for strontium containing clots in comparison to calcium containing clots. This

may be explained by observations that calcium and strontium are capable of occupying similar binding sites, in particular the FXIII binding site.

For the initial experiments, cells were seeded on the surface of clots. One of the reasons for choosing this seeding method is that some cell types when seeded within the clots suffer largely from cell death and there is migration of the cells to the surface of the clot. One possible explanation for this effect may be explained when osteoblast-like cells are cultured in a medium supplemented with CaCl_2 . Figure 5 shows the result of SaOS-2 cell culture on tissue culture plastic in the presence of 12.5 mM CaCl_2 . Cell death (as measured by an MTS assay) occurs for the cells cultured in the presence of the calcium chloride. This occurs within the first 24 hours of the cell culture. By contrast there is only a slight reduction in the proliferation of cells cultured in the presence of strontium containing compounds. It is important to point out that some cells have a requirement for high calcium i.e., fibroblasts and keratinocytes, and thus would not be affected by the calcium concentration of the clot.

Example 2: Fibrin/Strontium Doped-Calcium Phosphate nanoparticles.

Thrombin was diluted to a concentration of 4 IU in the thrombin buffer. The fibrinogen was mixed with thrombin in a 1:1 ratio. For this 2 ml of the thrombin solution can be transferred to a 5ml syringe. 2 ml of fibrinogen (Tisseel, Baxter, Clottable Protein, [fibrinogen and fibronectin] 72-110 mg/ml) was transferred to a separate 5ml syringe. The particles (nanoparticles less than 1 μm) are incorporated as a percentage weight of the final clot volume ((w/v). These are weighed and placed into another 5ml syringe.

The syringes containing the particles and the thrombin are connected via a Luer adapter and the thrombin and particles homogenised by transferring the contents from syringe to syringe. The syringes containing the thrombin/particles and the fibrinogen are connected via a Luer adapter and the contents homogenised. The material remains liquid for approx 30 seconds during this time it can be injected into the defect.

For *in-vitro* experiments, the clots are prepared by pipetting 150 μl of the fibrinogen solution to the wells of a 24 well plate. The particles (nanoparticles less than 1 μm) are added as percentage weight of the final clot volume (w/v). The plate is put on plate shaker to ensure an even distribution over the well bottom. 150 μl of the thrombin solution is then added to the well and the plate put on a plate shaker to ensure homogeneous clots. In the preliminary studies, a human osteoblast like cells (SaOS-2 or NHOst) were cultured on the clots for up to 14 days to see if any differences in cell proliferation, cell differentiation could be observed.

Qualitative analysis for cells seeded on the particle containing clots show good biocompatibility, when compared to normal fibrin clots (Figure 6). Although not quantified, it appears that the cells on the fibrin clots without particles are more rounded in morphology while those on the particle containing clots are more spread. Further evidence of this can be
5 seen in transverse sections of the clots (Figure 7). For this, cells were seeded in the clots. After a few days the cells in the fibrin clots had migrated to the surface of the clot. By comparison, cells in the particles containing clots remained in the clots and have spread out showing a favorable morphology.

Example 3: Use of Strontium Doped Hydroxyapatite In Rabbit Femoral Confyle Defect

10 Model.

The studies described above suggest that strontium stimulates bone formation and at the same time represses bone resorption. Previous studies investigated the effect of SrCl₂ on osteoblast like cells and on primary osteoblasts. In the course of the attempt to identify a formulation that can be used in vertebral augmentation, a modified hydroxyl apatite that was
15 doped with strontium, was tested in a rabbit femoral condyle defect model to assess the potential of strontium to stimulate bone formation. Calcium hydroxyl apatite can be produced at the bench by stirring calcium nitrate and ammonium phosphate together at a high pH value (adjusted with ammonium hydroxide). The resulting precipitate can be centrifuged, washed, dried and calcined to obtain a hydroxyl apatite like substance. By combining calcium nitrate
20 with strontium nitrate in the respective percentage of substitution it is possible to produce strontium-calcium hydroxyl apatite like particles that can be injected together with fibrin into a bone defect.

This example shows data that shows that strontium substituted calcium hydroxyl apatite like particles stimulate new bone formation better than fibrin alone or pure calcium
25 hydroxyl apatite like particles. These results provide *in vivo* corroboration of the data obtained during preliminary cell culture.

Materials and Methods:

The following chemical reagents were used in the studies described in the present example. Calcium nitrate tetrahydrate; 99% A.C.S.reagent [Sigma-Aldrich; 237124-500G; FW: 236,15]; Strontium nitrate p.A. >99% [Fluka; 85899 500g; Lot&Filling Code: 1086321, 53706181; FW: 211,63]; Ammonium phosphate biphasic p.A. [Riedel-de Haën; 30402 500g; FW: 132,06] ; Ammonium hydroxide [Sigma-Aldrich, 318612-2L; batch#: 11103PD; FW: 35,05; 5N in H₂O]; EtOh 96%; Fibrinkleber [Baxter AG; Fibrinkleber TIM 3; 08P6004H;

5ml; 1500434]; Thrombin [Baxter AG; B205553 thromb. SD TIM 5; 500IE; US 5ml]; Calcium chloride dihydrate (min. 99%) [Sigma; C7902-1KG; batch#: 044K0160]; and Sodium chloride [Merck, 1.06404.1000 1kg; Charge/Lot: K38062004 745; FW: 58,44.

The experiments employed various solutions as follows: 40mM CaCl_2 +200mM NaCl:
5 1.47g CaCl_2 + 2.92g NaCl in 250ml ddH₂O; lyophilized thrombin- reconstituted in 5ml
40mM CaCl_2 +200mM NaCl and lyophilized fibrinogen – reconstituted in 5ml of 3000 KIE/ml
Aprotinin.

Experiments were performed on 4 tests groups with 6 rabbit knees each as follows:

Group 1. fibrin + thrombin (8IU/ml final concentration)

10 Group 2. fibrin + thrombin (8IU/ml final concentration) + 100% Ca (0% Sr
substitution)

Group 3. fibrin + thrombin (8IU/ml final concentration) + 75% Ca (25% Sr
substitution)

15 Group 4. fibrin + thrombin (8IU/ml final concentration) + 20% Ca (80% Sr
substitution).

Preparation of Test Materials:

Fibrinogen was reconstituted and aliquoted in 1ml syringes [Braun; omifix – 1ml; Luer] with 0.5ml fibrinogen per syringe. Thrombin was reconstituted and diluted with 40mM CaCl_2 +200mM NaCl to 16 IU/ml. This was also aliquoted in 1ml syringes, 0.5ml per syringe.

20 The hydroxyl apatite powders were produced by stirring together equal volumes of 2M calcium nitrate solution (or according to percentage of strontium substitution also strontium nitrate, the resulting solution has to have 2M in total) and 1.2M ammonium phosphate solution. Upon addition of ammonium phosphate to the calcium nitrate a pasty substance precipitated. A subsequent addition of an equal volume of ammonium hydroxide elevated the
25 pH of the precipitate to 11 and made the pasty precipitate liquid. After thorough stirring the mixture was centrifuged, the supernatant was discarded and the precipitate was washed two times with alcohol (ethanol 96%) and one time with ddH₂O. Between the washing steps the precipitate was always elutriated, centrifuged and the supernatant was discarded. Thereafter the precipitate was dried at 60°C under vacuum for one day, milled and calcined for 1 hour at
30 1100°C.

After cooling the hydroxyl apatite like particles were sterilized with heat and aliquoted in 1ml syringes, 0.3g per syringe.

Treatment of Rabbits

12 rabbits were used to perform the main experiment. They were sedated and a bore hole (diameter 4.5mm) was drilled into the femoral condyles. These drill holes were filled each with one of the test materials by swooshing the thrombin component with particles and thereafter with fibrinogen, or just thrombin with fibrinogen as a control. The cone of the 1ml
5 syringes fit perfectly into the drill holes, so a direct application was possible.

After injection of the respective material (randomized for the 24 knees) the skin was sewed and the rabbit was kept monitored for the following 8 weeks.

Post-operation Analysis

After the 8 weeks the rabbits became euthanized and the knees were analysed by μ CT
10 and thin sections were histologically stained.

Results

μ CT analysis: Due to the high opacity of the strontium samples it was difficult to obtain quantitative results, so the analysis was done semi-quantitative by assessing the μ CT pictures with the eye and quantifying them. Evaluation of bone formation was performed in
15 three levels (1: low; 2: medium; 3: high). The evaluation of a closed drill hole was done by giving a "+" for a closed drill hole and a "-" for a not closed drill hole. The data are shown in graphs at Figures 8 through 14. All graphs are averages of evaluable treated animals, whereas the μ CT pictures are snap shots.

Figure 8 shows graphical representation of completely closed drill holes (both sides
20 are closed). None of the evaluated rabbit condyle defects filled with fibrin was closed on both sides, hence zero percent completely closed drill hole borders are seen in Figure 8. The substitution of 25% Sr in the particles yielded the highest value of 80% closed drill hole borders.

In Figure 9, there is the μ CT of a rabbit femoral condyle in the presence of fibrin. The
25 defect is still visible, but no residual material (fibrin) is visible; one side of the drill hole is still open.

Addition of strontium produces marked effects. Figure 11 shows μ CT of a rabbit femoral condyle in 80% Sr material. While the defect is still visible, most of the defect is filled; the material (Sr80%) is strongly visible. New bone formation is clearly identifiable and
30 both sides of the drill hole are closed.

The above results also were confirmed using histological studies. Figure 12 shows a histological stained thin section of a rabbit femoral condyle defect treated with fibrin. No test substance is present. Accordingly no signs of inflammation are found. Only a few, short cancellous bone trabeculae are found inside the drill hole. At the opening of the bur canal, the

newly formed bone substance is of cancellous shape. Blood vessels are almost regularly distributed inside the drill cavity, showing only few spots that are less vascularised. Several larger blood vessels are in close vicinity to the bone substance at one side of the drill cavity.

5 In the samples treated with 80% strontium in the fibrin clot (Figure 13), 40-70% of the drill canal is filled with the test substance. The test substance is in all samples of elongated shape inside the drill cavity. In one sample it is more granular, while the other two exhibit a coarser test substance. In 2 of 3 samples fibrin is present as large patches close to the test substance. Inflammations are few in one sample, and vary from 3-10 large inflammations in the other specimens. In one sample the test substance is in direct contact to the newly built
10 bone tissue, whereas it lies more distantly in the other two. Two samples have regularly distributed blood vessels inside the drill cavity, while the third has a more clustered vascularisation.

Discussion

The μ CT data shows that formulations containing Sr 25% substituted hydroxyl apatite
15 like particles trigger a closure of a drill hole better than the other tested substances, induce a comparable bone formation to 80% substituted particles, while being less dense.

Fibrin alone triggers less bone formation and the drill holes are closed only on one side. Formulations containing pure calcium hydroxyl apatite like particles are not so dense, but seem not to induce bone formation or a closure of the drill holes.

20 The high strontium concentration formulation is very dense, it induces new bone formation, but not significantly more than Sr 25%. Furthermore drill hole closure is worse compared to Strontium in a lower concentration, thus even low concentrations of strontium is sufficient to induce bone formation.

Histological results suggest that the substitution of strontium in calcium hydroxyl
25 apatite like particles induces formation of new bone. Vascularisation, a prerequisite for the immigration of osteoblasts and hence new bone formation, was detected in all the samples.

Example 4: Strontium has a synergistic effect with PTH on osteoblast cells.

The present example describes *in vitro* studies on rat osteosarcoma cells to investigate if a combination of parathyroid hormone (PTH) and Strontium (used as SrCl₂) on activation
30 of bone formation factors like increased cAMP production in osteoblasts. The studies described herein show that SrCl₂ has a positive synergistic effect with PTH in generation of cAMP in osteoblast cells. No such effect was observed for cells treated with CaCl₂. As cAMP is known to induce anabolic bone formation, the data presented herein support a

conclusion that a combination therapy of Sr and PTH will lead to increased bone formation in vivo.

Materials and Methods

5 The osteosarcoma cell line UMR-106 (NewLab Bioquality AG, Erkrath, Germany) was used to perform the bioassay.

The assays described below used the following media:

Cell culture medium: DMEM (Sigma, D6546; incl. 4500mg/l Glucose, Na-Pyruvate, Na₂CO₃, suppl. with 0.584g/l L-glutamine); 10% FCS; 2mM L-Glu.

10 *Starvation medium:* DMEM (Sigma, D6546; incl. 4500mg/l Glucose, Na-Pyruvate, Na₂CO₃, suppl. with 0.584g/l L-glutamine); 2mM L-Glu;

SI medium: 10 ml starvation medium; 2 mM IBMX

20 mM SrCl₂ in starvation medium: 19,6 ml Medium 0,4 ml 1M SrCl₂

20 mM CaCl₂ in starvation medium 19,6 ml Medium 0,4 ml 1M CaCl₂.

Cell Culture

15 UMR-106 cells were seeded in growth medium at a density of 30000 cells/cm² and incubated at 37°C/ 8.0% CO₂. After 24 hours, medium was exchanged with either fresh medium, medium containing 20 mM SrCl₂ or medium containing 20 mM CaCl₂. Cells were further incubated at 37°C/ 8.0% CO₂ for 24 hours. Cells were harvested according to the following procedure:

20 Cells were washed twice with HBSS and detached from the surface using 6ml trypsin/EDTA for 3min at room temperature. Trypsin digestion was stopped with 12ml growth medium. Following centrifugation (3min, 1000rpm, RT) cells were resuspended in 12ml starvation medium and counted with a CASY cell counter. The rate of dead cells was below 10% in every experiment. Cells were resuspended to a final concentration of 1.6 x 10⁶
25 cells/ml in starvation medium. 50µl of cell suspension was transferred into each well of a 96-well plate and incubated for 30min at 37°C, 8.0%CO₂.

Treatment of cells with 264 µg/ml TGplPTH samples in fibrinogen solution

Samples were diluted in freshly prepared starvation medium containing 2mM IBMX (SI medium). For preparation of SI-medium 30 µl of a 0.67M IBMX stock in DMSO was
30 added to 10 ml of starvation medium.

All sample dilutions were prepared with this medium to inhibit phosphodiesterase activity in UMR-106 cells (Janik, P., 1980; Chasin M. and Harris, D.N., 1976). 50µl of diluted samples (as indicated in results) were added to the cells after 30min incubation at 37°C. For

cAMP production cells were incubated for 1h at 37°C, 8.0%CO₂. Each sample concentration was added to cells at least in duplicates following cAMP analysis in duplicates.

cAMP Biotrak Enzyme Immune Assay

Reagent preparation for cAMP EIA. Assay buffer, lysis reagent 1A/1B, lysis reagent 2A/2B, cAMP standard, antiserum, cAMP Peroxidase conjugate and wash buffer were prepared according to the manufacturer's manual (cAMP Biotrak EIA kit, GE Healthcare). 1M sulfuric acid stop solution was prepared by dilution of 53ml H₂SO₄ (conc.= 18.76M) with 947ml ddH₂O.

Cell lysis and dilution of cAMP For extraction of cAMP 100µl of cell suspension containing PTH was incubated with 25µl (final dilution 1:5) lysis reagent solvent 1A that is part of the cAMP Biotrak EIA kit (GE Healthcare). For total lysis, cells were shaken for 15min at 500rpm at room temperature. The extracted cAMP was finally diluted 1:20 with lysis reagent 1B (cAMP Biotrak EIA kit) (1:1 dilution in the assay plate (125µl lysis reagent 1B were added) followed by 1:10 dilution on the ELISA plate (90µl lysis reagent 1B + 10µl diluted cell suspension).

Preparation of cAMP working standard. The lyophilized cAMP standard for non-acetylated assay (cAMP Biotrak EIA kit) was resolved in assay buffer to get a concentration of 32pmol/ml. A double dilution series was prepared ranging from 32pmol/ml to 0.5pmol/ml.

Internal control. 100µl of each standard and sample dilution were transferred to the appropriate well and analyzed in duplicates. Additionally, two different internal controls, the non-specific binding (NSB) control and a zero control (0) were necessary to show the specificity of the cAMP ELISA and were performed as recommended by the manufacturer (GE Healthcare).

Enzyme Immunossay procedure. 100µl of antiserum was added to all wells except the NSB control. Antibody reaction was performed for 2h at 4°C with shaking. Following incubation with 50µl cAMP peroxidase conjugate for 1h at 4°C with shaking, all wells were washed four times with 300µl wash buffer. Finally, 150µl TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) was added to each well and substrate reaction was allowed for 10min at room temperature. The reaction was stopped by adding 100µl 1M H₂SO₄ and the optical density was determined immediately in a plate reader at 450nm.

Data analysis. The optical density was determined in a plate reader (Synergy HT) by measuring the absorbance of the samples at 450nm using the software KC4. Background corrections, calculations of mean values, standard deviations, coefficients of variation and generation of standard curves were performed in Microsoft Excel 2000. Sigmaplot 9.0 was

used for 4-parameter-fits and EC50 calculations. PLA1.2 (Stegmann Systemberatung) was used for Parallel Line Analysis and detection of Relative Potency.

5 *Percentage of bound cAMP peroxidase conjugate.* The percent bound cAMP peroxidase conjugate for each standard and sample was calculated using the following relationship:

$$\frac{B}{B_0} (\%) = \frac{(OD_{sample} - OD_{nsb}) \times 100}{(OD_{zero} - OD_{nsb})}$$

OD sample.....OD450 of specific sample
OD zero.....OD450 of peroxidase conjugated cAMP only
OD nsb.....OD450 without cAMP antibody

Standard curve. The cAMP standard curve was generated by plotting the percent B/B0 (y-axis) as a function of the log c(cAMP) (x-axis).

10 *cAMP concentration of the samples.* Taking into account the dilution factor (20x) the produced cAMP amounts were calculated using the parameters (slope and intercept) of the standard curve.

Linearity. The correlation coefficient of standard curve of the cAMP ELISA ($R^2 \geq 0.95$) was evaluated

15 *Preparation of Samples for Bioassay Analysis.* For analysis, samples were diluted in starvation medium containing 2mM phosphodiesterase inhibitor IBMX (SI-medium) to a final concentration of 2400nM TGplPTH (13,2 µg/ml TGplPTH). For all samples 150µl of the following 8 serial dilutions were prepared and 50µl were added directly to the cells (total volume on cells: 100µl). For all samples and all dilutions, mean values of OD450, standard deviations, cAMP concentrations and coefficients of variations were calculated.

c(TGplPTH) nM	preparation	c(TGplPTH) µg/ml
2400nM (1200nM on cells)	see above	13,2
1200nM (600nM on cells)	1:1 in dilution medium	6,6
600nM (300nM on cells)	1:1 in dilution medium	3,3
300nM (150nM on cells)	1:1 in dilution medium	1,65
150nM (75nM on cells)	1:1 in dilution medium	0,83
75nM (38nM on cells)	1:1 in dilution medium	0,42
38nM (19nM on cells)	1:1 in dilution medium	0,21
19nM (10nM on cells)	1:1 in dilution medium	0,1

Table of Serial Dilution. For generation of a dose response curve seven one-to-one serial dilution steps were performed for each sample and all dilutions were analyzed in triplicates.

Results

5 The influence of SrCl_2 and CaCl_2 on PTH bioactivity was independently monitored over five different experiments (Figure 14). These studies showed that a 24h pre-incubation of UMR-106 cells with 20mM SrCl_2 prior to TgplPTH treatment leads to twofold increased bioactivity, whereas CaCl_2 shows no change in PTH bioactivity (Figure 14). These results indicate that strontium and PTH have a synergistic effect on cAMP production and support
10 the conclusion that a combination of PTH and strontium would lead to anabolic bone formation *in vivo*.

Claims:

What we claim is:

1. A composition comprising fibrin, thrombin and a strontium-containing compound for use in bone healing or bone growth.
2. The composition of claim 1, wherein the composition is in a gel, putty, paste or liquid form.
3. The composition of claims 1 or 2 further comprising a plasticizer.
4. The composition of claim 3 wherein the plasticizer is an iodine-containing compound.
5. The composition of claim 4 wherein the iodine-containing compound is selected from the group consisting of diatrizoate, iodecol, iodixanol, iofratol, iogulamide, iohexol, iomeprol, iopamidol, iopromide, iotrol, ioversol, ioxagulate and metrizamide and mixtures thereof and polyvalent alcohols.
6. The composition of claims 1, 2, 3, 4, or 5 wherein the composition can be delivered, as a liquid, paste or a gel prior to or during the gelling phase or as a pre-formed gel, paste or putty into tissue defects.
7. The composition of claims 1, 2, 3, 4, or 6 wherein the composition contains one or more extra-cellular protein selected from the group consisting of extracellular matrix proteins such as fibronectin, cellular associated proteins, plasma derived proteins such as blood clotting factor XIII, proteases and protease inhibitors.
8. The composition of claims 1, 2, 3, 4, 6, or 7 wherein the composition is resorbed and replaced with tissue during the healing process.
9. The composition of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 wherein the composition further comprises a clotting inducing agent such as protamine, snake venom, transglutaminases, FXIIa, or a physiologically acceptable alkaline buffer system.

10. The composition of claims 1 or 2 wherein the strontium-containing compound is in a soluble microparticulate, granular form or in a solid form.
11. The composition of claim 10, wherein the strontium-containing compound is made by adding strontium into a calcium-containing compound to producing a material that comprises calcium and strontium containing salts.
12. The composition of claim 11, wherein said calcium-containing compound is a calcium phosphate.
13. The composition of claim 12 wherein the calcium phosphate is selected from the group consisting of tricalcium phosphate, alpha-tricalcium phosphate, beta tricalcium phosphate, polymorphs of calcium phosphate, hydroxyapatite, calcium carbonate, calcium sulfate and combinations thereof.
14. The composition of claim 11, wherein the strontium-containing or calcium containing compounds have a particle dimension ranging from 100 nanometers to 50 millimeters.
15. The composition of claim 11, wherein the strontium containing or calcium containing compounds have a particle dimension of 0.5 to 5 millimeters.
16. The composition of claim 11, wherein the percentage of strontium salt to calcium salts in said composition ranges from 0.25% to 100% strontium containing salts.
17. The composition of claim 10, wherein the strontium-containing compound is made by adding strontium into a bioactive glass to produce a strontium-containing bioactive glass material.
18. The composition of claims 1, 2, 3, 6, 8, 10 11 or 17 wherein the strontium containing compound is selected from the group consisting of strontium chloride, strontium ranelate, strontium acetate, strontium glutamate, strontium aspartate, strontium malonate, strontium maleate, strontium ascorbate, strontium threonate, strontium lactate, strontium phosphate, strontium apatites, strontium pyruvate, strontium alpha-ketoglutarate and strontium succinate.

19. The composition of claims 1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 17 or 18 further comprising a strontium co-ligand selected from the group consisting of groups calcimimetics, osteocalcin, amino acids such as L-arginine, and, arginomimetics and arginine analogs.
20. The composition of claim 3 wherein the plasticizer is a polyethylene glycol, a polyvalent alcohol, glycerol, or sugar selected from the group consisting of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, polysaccharides, and combinations thereof.
21. The composition of claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19 or 20 further comprising a protein selected from the group consisting of bone morphogenic proteins, parathyroid hormone (PTH), calcitonin, bisphosphonates, epidermal growth factor, insulin like growth factors and TGF growth factors.
22. The composition of claim 1 wherein gelation of the composition occurs upon mixing of the various components.
23. The composition of any of the preceding claims wherein said composition is an injectable composition.
24. A method of treating diseased, injured or deficient bone in a living subject, comprising injecting into the cancellous bone of said subject a composition comprising a composition of claim 23.
25. The method of claim 24 wherein injecting said composition into the cancellous bone of said subject causes a rate of healing that is faster than observed with the application of a similar composition that does not contain strontium.
26. A method of repairing a bone having a defect comprising: (a) mechanically fixating the bone or portions thereof; and (b) filling the defect with a composition of any of claim 1-23 in an amount effect cause repair of said defect.

27. The method of claim 26, wherein said defect is a bone fracture and said repair is bone healing of said fracture.
28. The method of claim 27, wherein application of said composition causes a rate of healing that is faster than observed in the absence of application of said composition.
29. The method of claim 27, wherein application of said composition causes a rate of healing that is faster than observed with the application of a similar composition that does not contain strontium.
30. The method of claim 25 wherein said bone is a long bone selected from the group consisting of a femur, a tibia, a humerus and a radius.
31. A method of promoting new bone growth at the site of a bone defect comprising contacting said site of defect with a composition of any of claims 1 through 23.
32. The method of claim 31, wherein the rate of said bone growth is faster in the presence of strontium in said composition as compared to bone growth seen in the presence of a similar composition that does not contain strontium.

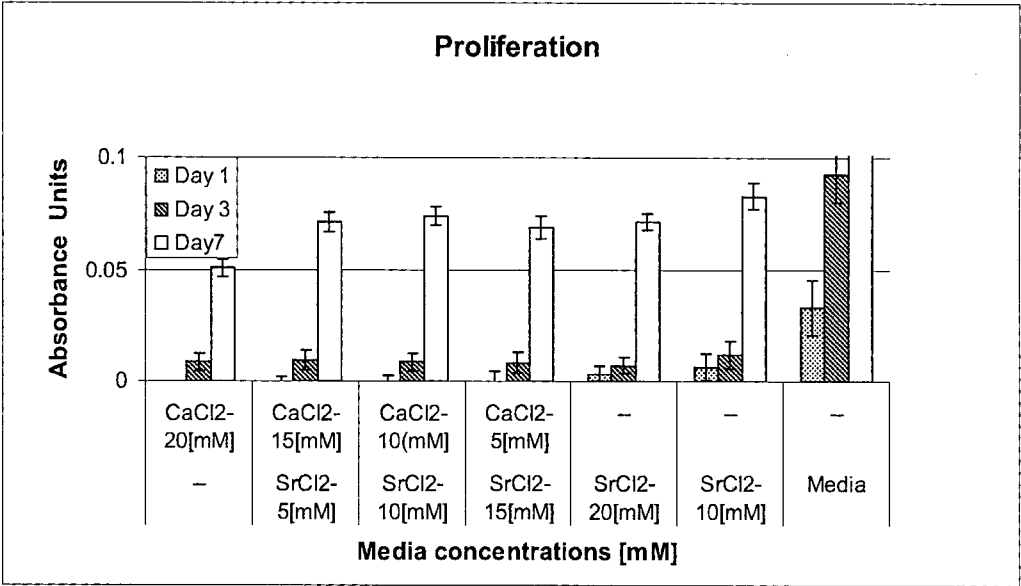


Figure 1

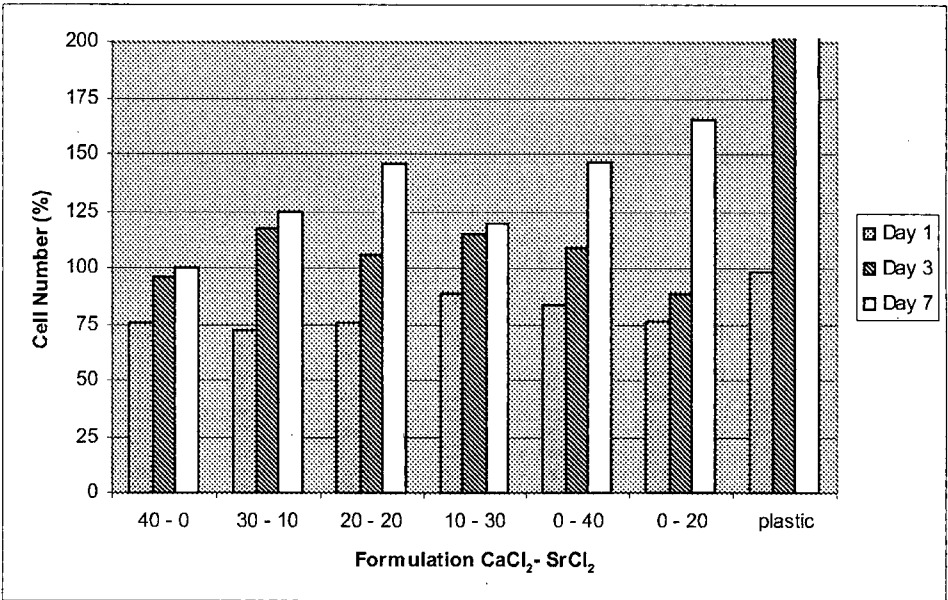


Figure 2

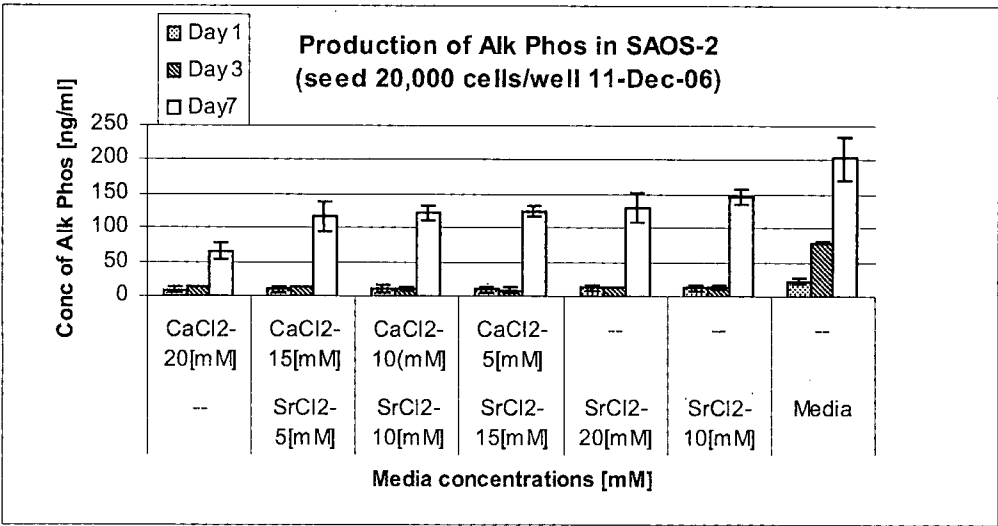


Figure 3.

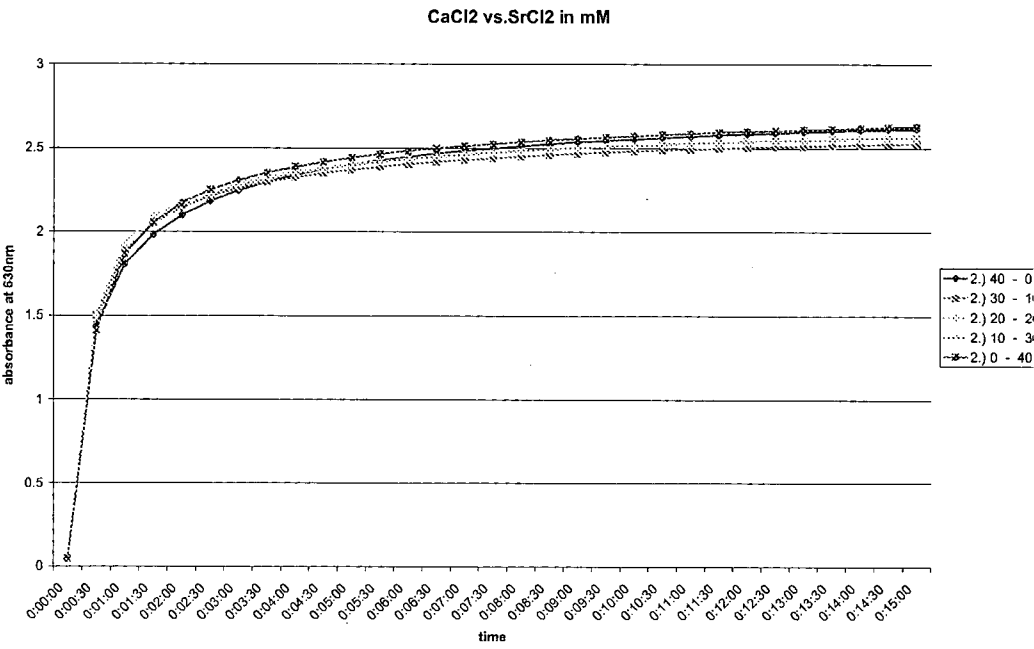


Figure 4.

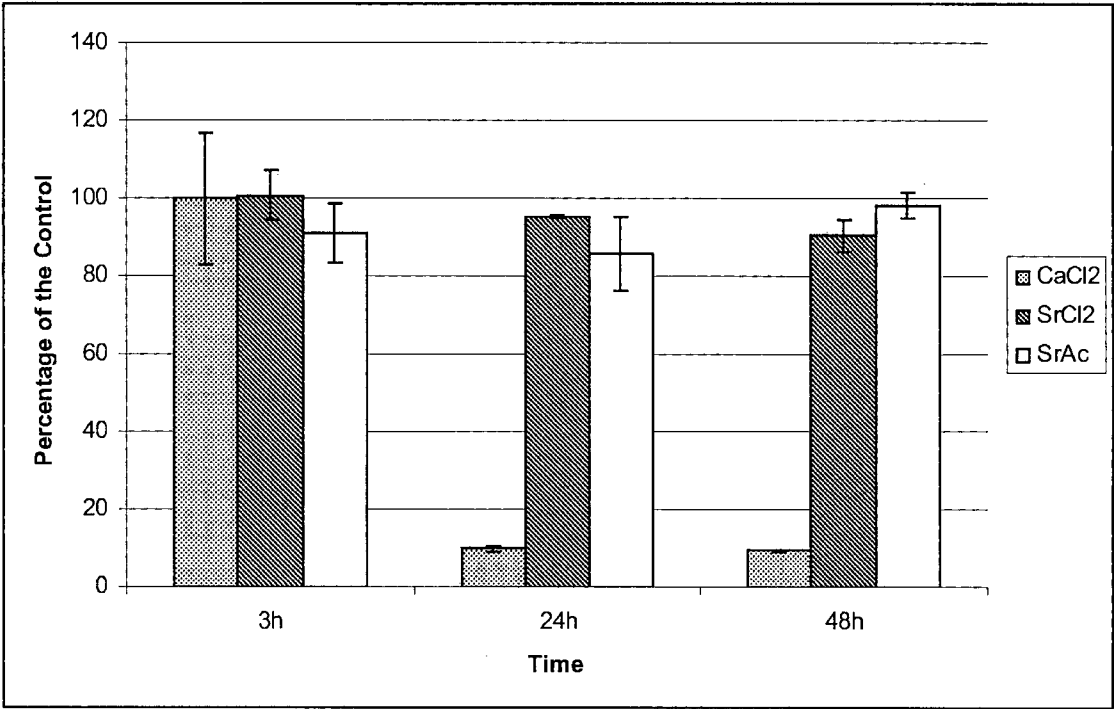


Figure 5.

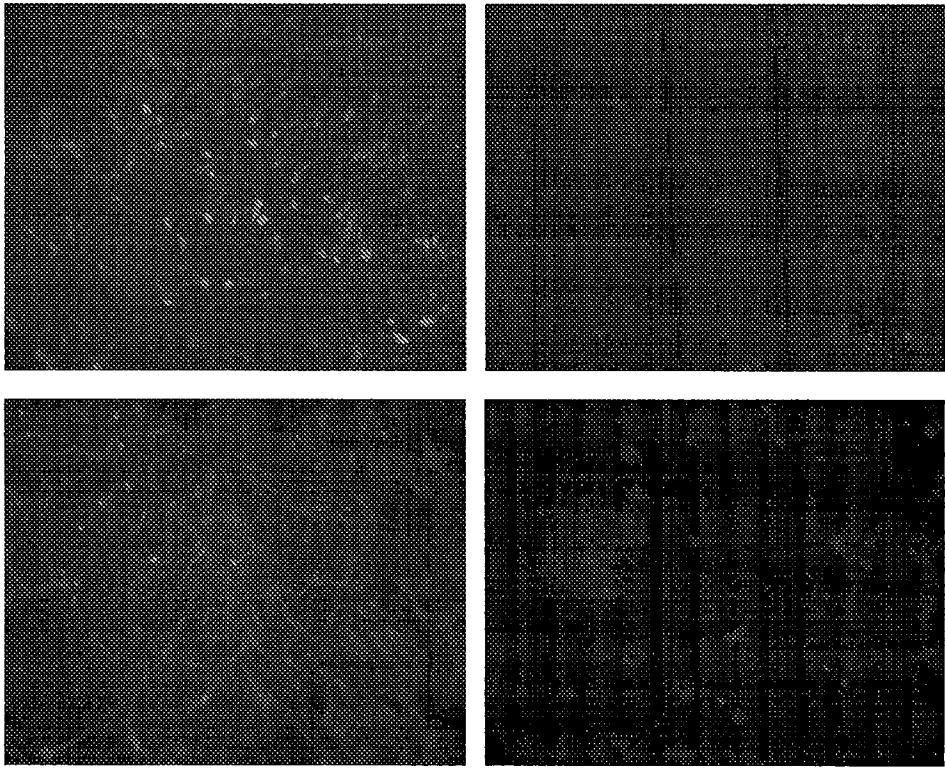


Figure 6

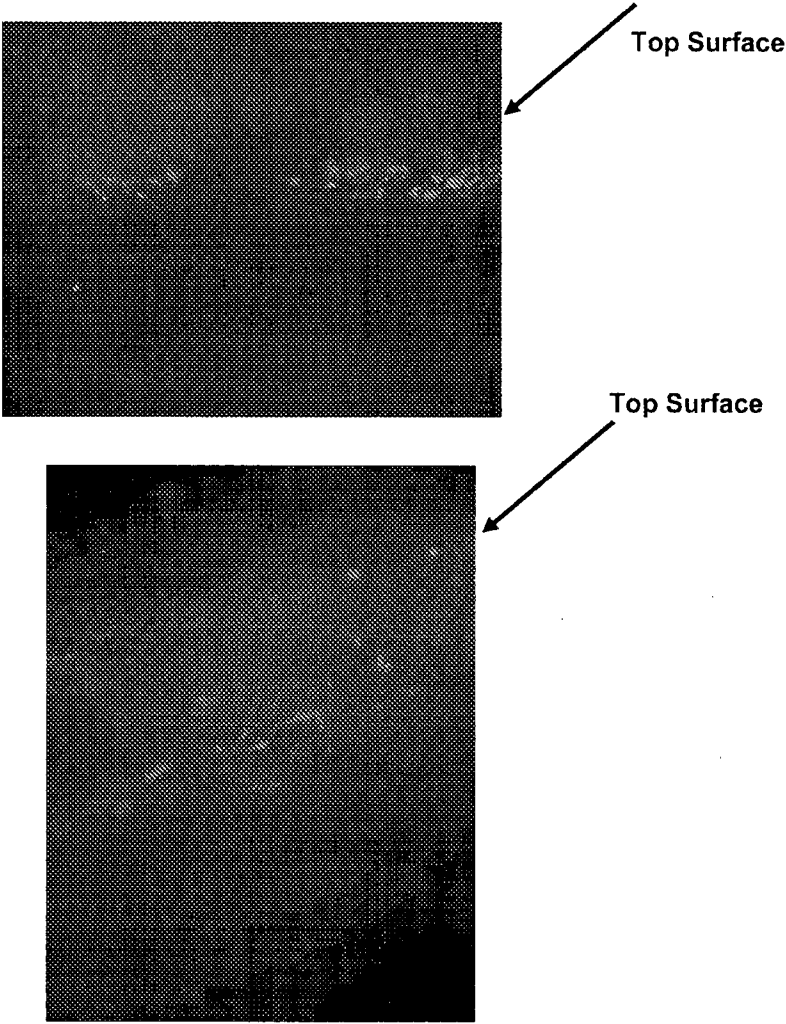


Figure 7

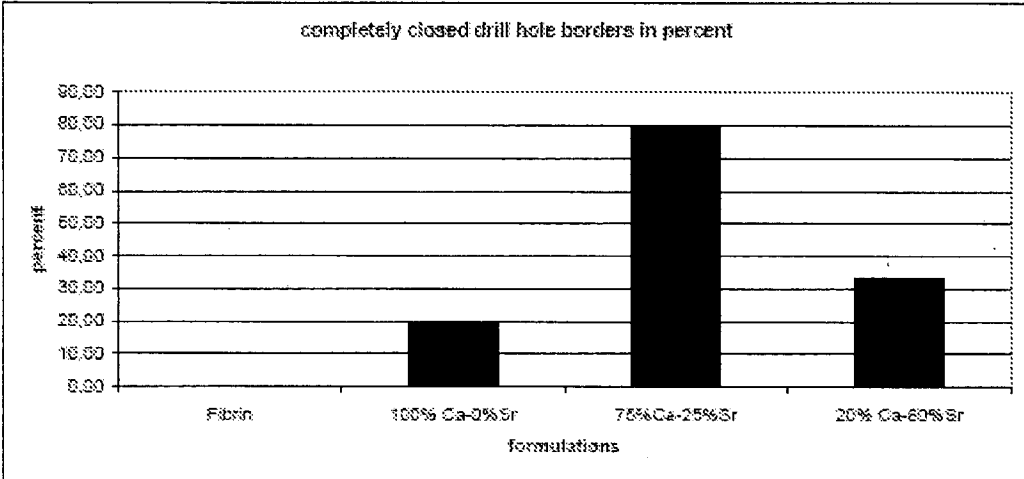


Figure 8:

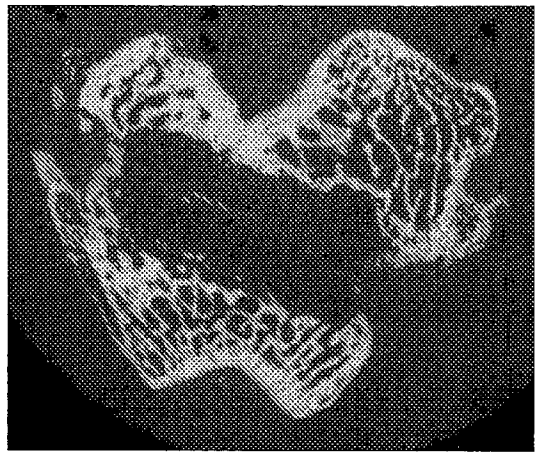


Figure 9

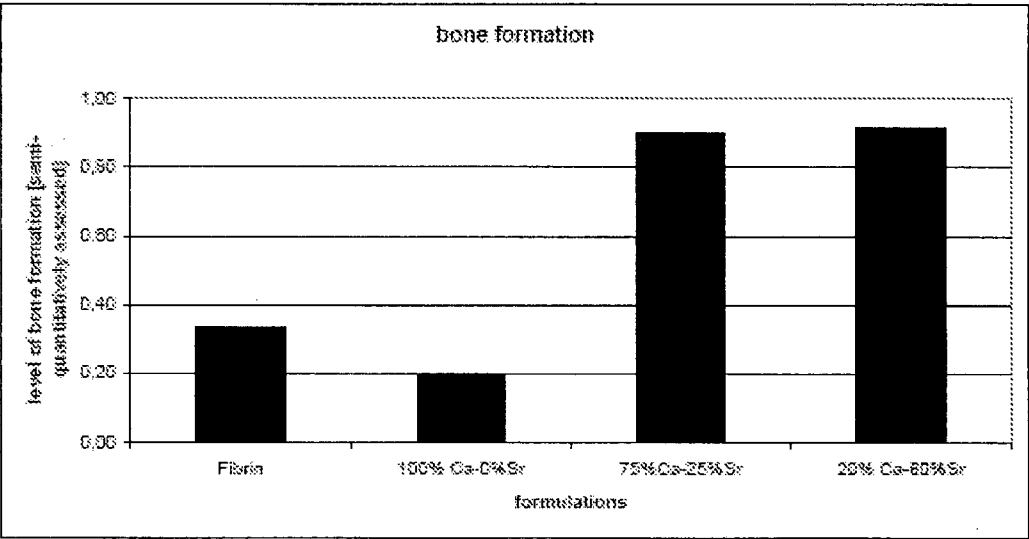


Figure 10:

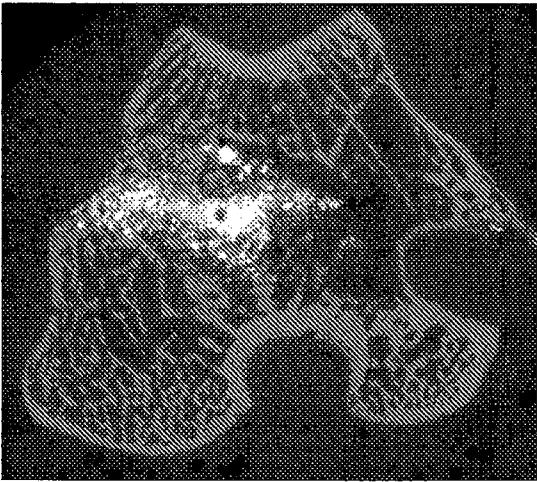


Figure 11

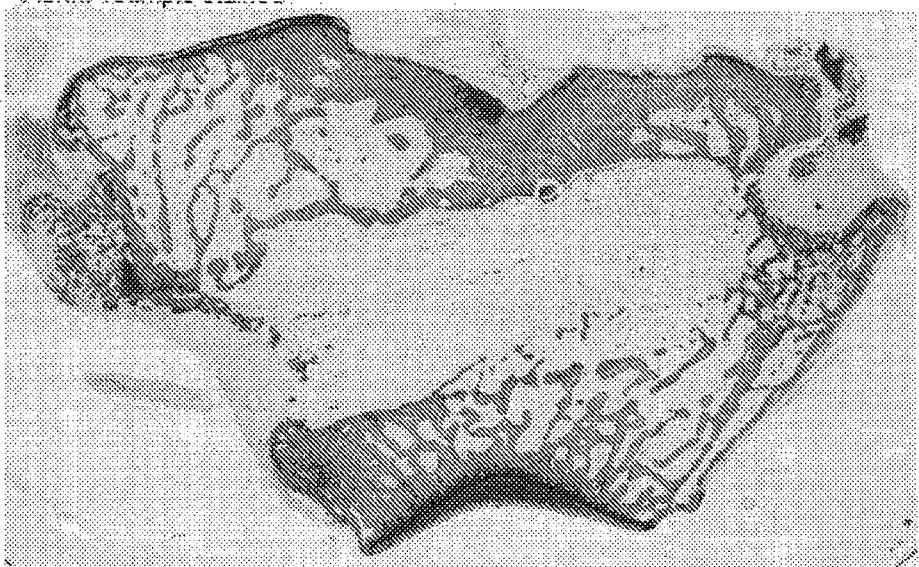


Figure 12

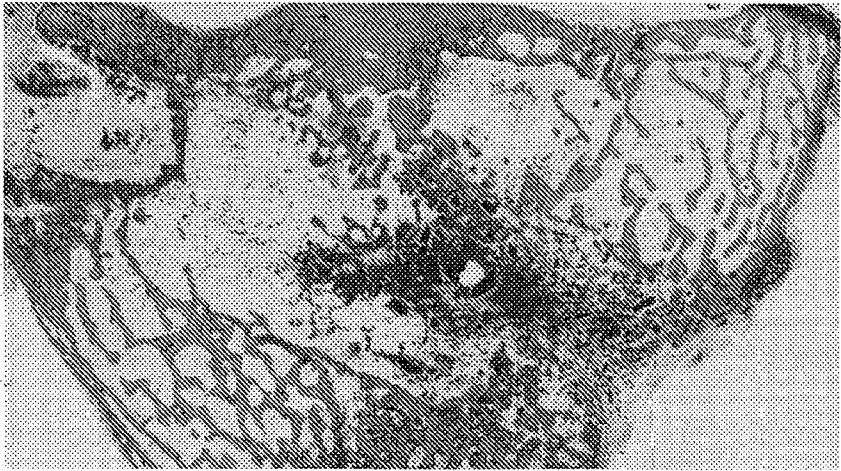


Figure 13

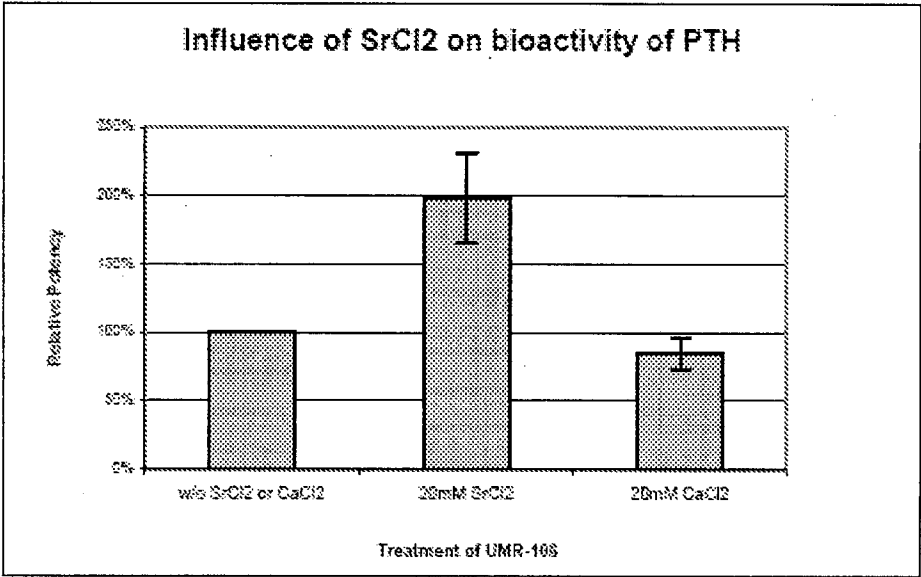


Figure 14

COMPUESTOS DE ESTRONCIO QUE CONTIENEN COMPOSICIONES DE
FIBRINA

La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense No. 60/925,716, que se presenta en Abril 23, 2007 y se incorpora específicamente aquí como referencia en su totalidad.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona de manera general con una composición para uso en cicatrización ósea y regeneración ósea y específicamente con un gel hidrogel viscoelástico o formulación líquida que comprende fibrinógeno, trombina y un componente inorgánico que comprende un compuesto que contiene estroncio (Sr) que contiene el compuesto y/o posiblemente otro metal tal como un calcio. El compuesto que contiene estroncio se puede disolver en las soluciones trombina o se agrega a la composición en forma particulada cristalina. Luego de mezclar los componentes, la gelación tiene lugar para formar una matriz.

Antecedente de la invención

La práctica actual en la regeneración y cicatrización ósea es llenar los vacíos óseos con un injerto óseo (auto o aloinjerto), un cemento óseo tal como polimetilmetacrilato (PMMA) o rellenar los vacíos con sal de calcio inyectable o implantable. Los autoinjertos son la elección 'estándar dorada' para esta aplicación pero existen problemas con las limitaciones de tejidos de donantes, trauma, infección y morbilidad. Existe un número de problemas con aloinjertos, que incluye el riesgo de transmisión de enfermedad e inmunogenicidad. Los auto y aloinjertos exhiben la pérdida de propiedades biológicas y mecánicas debido al remodelamiento secundario. Estas limitaciones han suscitado interés en

materiales alternativos para injertos óseos (Parikh SN. 2002; J. Postgrad. Med. 48: 142- 148).

El PMMA es un material polimérico no reabsorbible. Durante su
5 polimerización el monómero no reacciona, el catalizador y los oligómeros de bajo
peso molecular quedan atrapados en el polímero. Estos químicos tienen el
potencial para lixiviar el material resultante en citotoxicidad localizada y respuestas
inmunológicas. La polimerización de PMMA tiene una alta exoterma que puede
10 originar potencialmente necrosis térmica. Esta exoterma también limita la
capacidad de PMMA para incorporar cualesquier agentes quimioterapéuticos o
farmacológicos. La fuga de PMMA de un defecto puede resultar en complicaciones
muy serias que incluyen la compresión de estructuras adyacentes (que requieren
cirugía adicional) y/o embolismo.

15 La matriz ósea en el nivel nano (10^{-9} m) se compone de fibras colagenosas
en el que se incrustan los microcristales de sales de calcio. Con el fin de estimular
la constitución natural del hueso, las sales de calcio se utilizan frecuentemente
para reparar el hueso. Existe un número de sales de calcio conocidas con base en
"rellenos de vacío inyectables." Una complicación principal con los cementos de
20 sal de calcio es su requerimiento para sedimentación in vivo que se alcanza
usualmente por reacción química. Así cualesquier materiales biológicos
incorporados en el relleno tal como células y agentes farmacológicos pueden ser
potencialmente perjudiciales. Adicionalmente si el relleno es muy "fluido" este
puede escapar del defecto en espacios adyacentes que conducen a la compresión
25 de las estructuras y posibles embolias. El escape de defectos próximos en las
articulaciones puede lesionar potencialmente la función de las articulaciones. La
sal de fosfato de calcio (CP) hidroxiapatita (Estructura $\text{HA Ca}^{10} (\text{PO}_4) (\text{OH})$) es
más cerrada en la fase mineral del hueso y se puede sintetizar fácilmente en el

banco. También es posible preparar HA donde otros cationes (por ejemplo, magnesio, sodio y estroncio) o aniones (cloro, flúor y carbonato) se sustituyen en el cristal. Se relaciona con la presente invención la sustitución de iones de calcio (Ca^{2+}) con iones de estroncio (Sr^{2+}) en los cristales CP. El estroncio y el calcio pertenecen a los elementos de tierras alcalinas, y se semejan uno al otro en más del 99% del calcio y estroncio total en el cuerpo que se localiza en el hueso. El estroncio es solo el elemento identificado por tener una relación positiva con la resistencia ósea, es decir, la resistencia mecánica del hueso se incrementa con el incremento del contenido de estroncio. Los efectos terapéuticos potenciales del estroncio se han conocido durante algún tiempo. Sin embargo, se ha sugerido en la literatura que el potencial terapéutico se ha podido pasar por alto debido a la confusión del Sr^{2+} normal, estable (^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr y ^{88}Sr) con sus isótopos radioactivos (^{85}Sr , $^{86\text{m}}\text{Sr}$, ^{87}Sr y ^{88}Sr) Dahl et al, Hueso; 28 (4) pp. 446-453. Recientemente, se han destacado los efectos terapéuticos del estroncio, y la investigación ha demostrado que las sales de estroncio estimulan la formación ósea e inhiben la resorción ósea in vitro (aún en bajas dosis) y in vivo, como se evalúa por la histomorfometría ósea en roedores y pacientes osteoporóticos. Ferraro et al, 1983; Calcif El tejido Int. 35:258-60.

Los efectos antiresorptivos y anabólicos poderosos del estroncio han conducido al desarrollo de un nuevo fármaco anti-osteoporótico. Se ha mostrado que el fármaco activo oral (ingrediente activo ranelato de estroncio) reduce el riesgo de fracturas vertebrales e incrementa la densidad mineral del hueso. Meunier PJ et al, 2004; N Engl J Med. 350(5):459-68. El fármaco se compone de una molécula de ácido ranélico unida a dos átomos de estroncio. El grupo ranelato se selecciona como el portador debido a que éste se tolera bien en el tubo GI. En el intestino los iones de estroncio se liberan del grupo ranelato que conduce a la absorción del estroncio mediante la mucosa intestinal. Luego de absorción, el estroncio exhibe

fuerte afinidad para el tejido óseo, y se llega a incorporar en la capa hidratada más externa de hidroxapatita. Una cantidad más pequeña se integra en el cristal óseo, cuando la relación de estroncio sobre los átomos de calcio no excede 1:10, ya que ni la formación ni las propiedades fisicoquímicas del cristal se alteran por la presencia de estroncio. El ranelato de estroncio se sugiere que es la primera medicación para desacoplar la formación ósea de resorción ósea. In vitro, el ranelato de estroncio incrementa la síntesis de proteína de colágeno y no colágeno, mejorando la diferenciación de pre-osteoblasto, inhibiendo la diferenciación de osteoclasto, reduciendo la función de osteoclasto e incrementando la apoptosis de osteoclasto. En modelos de animal, el incremento en la densidad ósea se correlaciona cercanamente con incrementos en la resistencia ósea biomecánica. En modelos de rata, el ranelato de estroncio incrementa la masa ósea y mejora la microarquitectura y la geometría del hueso, que resulta en la resistencia ósea incrementada. En ratas ovariectomizadas (un modelo para osteoporosis), el ranelato de estroncio reduce la resorción ósea pero mantiene alto la formación ósea. Todos los determinantes de la resistencia ósea se influyen positivamente por el tratamiento con ranelato de estroncio (masa ósea, dimensión, microarquitectura, y calidad de tejido óseo intrínseca). El incremento en las propiedades mecánicas óseas se caracteriza por un incremento en la carga máxima pero también por un mejoramiento dramático en la falla de energía, que es esencialmente debido a un incremento en la energía plástica. Kendler, 2006; Curr. Osteopor. Rep. 4(1):34-9; Marie, 2006; Curr. Opin. Rheum. 18 Suppl:SI 1-5; Ammann, 2006, Bone. 38(2 Suppl 1): 15-8. Aunque el modo de acción del estroncio no se entiende completamente, el incremento en la osteogenia se considera que no se asocia con cambios en los niveles circulantes de 1,25(OH)₂ vitamina D o en efectos paratiroides de hormona. El estroncio ha mostrado la eficacia anti-fractura en todos los sitios en un gran número de mujeres postmenopáusicas. Close et al, 2006; Expert Opin Pharmacother 7(12): 1603-15.

La aplicación de estroncio localizada en la forma de un cemento óseo que contienen estroncio también se ha investigado por otros investigadores Wong, Chi-Tak, 2004, "Osteoconduction and osseointegration of un strontium-containing hydroxyapatite bioactive bone cement: in vitro and in vivo investigations. Publisher: University of Hong Kong" (Pokfulam Road, Hong Kong); Zhao et al, 2004; J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 69(1):79-86. El cemento óseo Sr-HA no reabsorbente se compone principalmente de relleno hidroxiapatita que contiene estroncio (Sr-HA) y resina dimetilacrilato diglicidiléter bisfenol A (BIS-GMA). Se propone que el material se debe utilizar para vertebroplastia como se debe suministrar por inyección y tiene mejores propiedades físico/mecánicas que PMMA. El cemento óseo hidroxiapatita que contiene estroncio (Sr-HA) se demuestra que es bioactivo in vitro e in vivo. In-vitro parece ser más eficaz que un cemento óseo de hidroxiapatita (HA) para la adhesión celular (SaOS-2) y la mineralización ósea. El cemento óseo Sr-HA in vivo unido con hueso Sr-HA.

En la Patente Estadounidense Nos. 5,736,132 y 5,549,904, los cuales se incorporan aquí como referencia, una transglutaminasa adhesiva complementada con el tejido adhesivo se dice que contiene preferiblemente un ión de metal divalente tal como calcio y estroncio en una cantidad en el rango de aproximadamente 0.5 mM a aproximadamente 100 mM en un pH de aproximadamente 7.0 a aproximadamente 8.5. Se reivindica que la transglutaminasa complementada adhesiva se puede utilizar en el tratamiento del tejido en fracturas de articulaciones, defectos cóndricos, defectos cóndricos superficiales, defectos de espesor total, disecantes osteocondritis, rupturas de meniscos, ruptura de ligamentos, ruptura de tendón, lesiones de músculo, lesiones de articulación miotendinosa, trasplante de cartílago, trasplante de hueso, trasplante de ligamento, trasplante de tendón, trasplante cóndrico, trasplante

condroóseo, fijación de injerto de piel y vasos sanguíneos, injertos de parches vasculares y anastomosis de vaso sanguíneo microvascular. El foco principal de las patentes es la incorporación de la transglutaminasa en un adhesivo.

5 En contraste, la presente invención no incorpora la transglutaminasa y está destinado para la inyección en defectos óseos o vacíos para el suministro local de estroncio y para ayudar en la formación del nuevo hueso. Los datos de la literatura muestran que el estroncio elemental es capaz de estimular la formación ósea aunque inhibe simultáneamente la resorción ósea.

10

Resumen de la invención

15

La presente invención proporciona una composición que se puede inyectar en un defecto óseo o vacío o en el espacio de médula del tejido óseo trabecular cuando se coloca temporalmente la médula ósea, para ayudar en la formación del nuevo hueso. Los datos muestran que el estroncio elemental es capaz de estimular la formación ósea aunque inhibe simultáneamente la resorción ósea.

20

En un aspecto, la invención proporciona una composición para uso en cicatrización ósea y crecimiento óseo en donde la composición comprende fibrina, trombina y un compuesto que contiene estroncio. La composición puede comprender adicionalmente un compuesto que contiene calcio. Preferiblemente, la composición es una composición inyectable que está en la forma de un gel inyectable, una masilla inyectable, pasta inyectable o forma de líquido inyectable.

25

En otras modalidades, la composición puede comprender uno o más agentes plastificantes. En ciertas modalidades, el plastificante es un compuesto que contiene yodo. El compuesto que contiene yodo de ejemplo para uso como

plastificantes aquí incluyen pero no se limitan a los compuestos seleccionados del grupo que consiste de diatrizoato, yodecol, yodixanol, yofratol, yogulamida, yohexol, yomeprol, yopamidol, yopromide, yotrol, yoversol, yoxagulato y metrizamida y sus mezclas y alcoholes polivalentes. En otras modalidades, el

5 plastificante es un polietilenglicol, un alcohol polivalente, glicerol, o azúcar seleccionada del grupo que consiste de monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, y sus combinaciones. En otras modalidades, el efecto plastificante se logra al ajustar la composición de compuestos de bajo peso molecular tal como, entre otros, cloruro de sodio y agentes caotrópicos.

10

La composición puede estar en la forma de un gel o un líquido. En ciertos aspectos, la composición se puede suministrar como un líquido o un gel antes de o durante la fase de gelificación o como un gel preformado en los defectos del tejido.

15

En otros aspectos de la invención la composición contiene una o más proteínas extracelulares seleccionadas del grupo que consiste de proteínas de matriz tal como fibronectina, proteínas asociadas a células o proteínas derivadas de plasma tal como factor XIII de coagulación sanguínea y proteasas.

20

En todavía otras modalidades, la composición puede comprender adicionalmente un agente que induce coagulación tal como protamina, veneno de serpiente, transglutaminasas, FXIIa, o un sistema de amortiguador alcalino fisiológicamente aceptable.

25

En modalidades específicas, la composición es de tal manera que la composición se reabsorbe y se pone con el tejido durante el proceso de cicatrización.

El compuesto que contiene estroncio utilizado en las composiciones de la invención puede ser uno seleccionado del grupo que consiste de cloruro de estroncio, ranelato de estroncio, acetato de estroncio, glutamato de estroncio, aspartato de estroncio, malonato de estroncio, maleato de estroncio, ascorbato de estroncio, treonato de estroncio, lactato de estroncio, fosfato de estroncio, apatitas de estroncio, piruvato de estroncio, alfa-quetoglutarato de estroncio y succinato de estroncio. Existen solamente compuestos que contienen estroncio de ejemplo y otros compuestos que contienen estroncio se pueden emplear fácilmente en las composiciones de la presente invención. La composición puede ser una que comprende adicionalmente un coligando estroncio seleccionado del grupo que consiste de grupos calcimiméticos, osteocalcina, aminoácidos tal como L- arginina, y, arginomiméticos y análogos arginina.

En las composiciones descritas aquí, el compuesto que contiene estroncio y/o el compuesto que contiene calcio puede estar en una forma de (micro)particulado o forma sólida. En modalidades de ejemplo, la forma (micro)particulada que contiene calcio o que contiene estroncio tiene un tamaño de diámetro de partícula que varía de 100 nanómetros - 500 μm . En otras modalidades, los componentes que contienen estroncio o que contienen calcio pueden tomar la forma de sólidos porosos o no porosos con dimensiones que varían de, por ejemplo 0.5 a 50 milímetros. Preferiblemente, el tamaño de partícula está en el rango de 0.5 a 5 milímetros.

En modalidades específicas, el compuesto que contiene calcio es un fosfato de calcio. El fosfato de calcio se puede seleccionar del grupo que consiste de trifosfato de calcio, alfa-trifosfato de calcio, beta-trifosfato de calcio, polimorfos de fosfato de calcio, hidroxiapatita, carbonato de calcio, sulfato de calcio y sus

combinaciones. En ciertas modalidades, se contempla que algo del calcio se sustituye con estroncio para proporcionar una mezcla de sales de calcio y estroncio.

5 En modalidades específicas, la relación o porcentaje de sales de estroncio a sales de calcio varía de .25% a 100%. En ciertas modalidades, las composiciones de la invención pueden comprender adicionalmente una proteína o combinación de proteínas seleccionadas del grupo que consiste de proteínas morfogénicas óseas, hormona paratiroide (PTH), calcitonina, bisfosfonatos, factor
10 de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento similar a insulina y Factores de crecimiento TGF. Se pueden utilizar cualesquier proteínas que tengan un efecto de aumento óseo o de promoción de crecimiento óseo. En todavía otras modalidades, el compuesto que contiene estroncio se hace al agregar estroncio en un cristal bioactivo para producir un material de cristal bioactivo que contiene
15 estroncio. En ciertas otras modalidades, la composición es una en la que la gelación de la composición ocurre luego de la mezcla de los varios componentes.

En modalidades preferidas, los métodos de la invención comprenden tratar la enfermedad, lesión o deficiencia ósea en un sujeto vivo al inyectar en el hueso
20 trabecular de dicho sujeto una composición que comprende una composición que contiene estroncio de la presente invención. Ventajosamente, la inyección de tal una composición dentro del hueso trabecular del sujeto origina una velocidad de cicatrización que es más rápida que la observada con la aplicación de una composición similar que no contiene estroncio.

25

También se contempla aquí un método para reparar un hueso que tiene un defecto que comprende: (a) fijar mecánicamente el hueso o sus porciones; y (b) rellenar el defecto con una composición de la invención en una cantidad que

origine el efecto de reparación de dicho defecto. En modalidades de ejemplo, el defecto es una fractura ósea y dicha reparación es cicatrización ósea de dicha fractura. En aspectos específicos de la invención, la aplicación de dicha composición origina una velocidad de cicatrización que es más rápida que la observada en la ausencia de la aplicación de dicha composición. Preferiblemente, la aplicación de dicha composición origina una velocidad de cicatrización que es más rápida que la observada con la aplicación de una composición similar que no contiene estroncio.

10 También se contempla un método para promover el crecimiento del nuevo hueso en el sitio de un defecto óseo que comprende poner en contacto dicho sitio de defecto con una composición de la invención. Preferiblemente la velocidad de dicho crecimiento óseo es más rápida en la presencia de estroncio en dicha composición cuando se compara con el crecimiento óseo visto en la presencia de
15 una composición similar que no contiene estroncio.

Breve Descripción de los Dibujos

20 La Figura 1 muestra la proliferación celular para células similares a osteoblasto humanas (SaOS-2) que crecen en coágulos que contienen estroncio. La anotación utilizada es Ca/Sr. Los valores citados son las concentraciones en el coágulo final. Para alcanzar estas concentraciones en el coágulo final, la concentración en el amortiguador se dobla.

25

La Figura 2 muestra un ensayo de ADN para células similares a osteoblasto humanas (SaOS-2) que crecen en coágulos que contienen estroncio. La anotación utilizada es Ca/Sr. Los valores citados son las concentraciones en el

amortiguador. Este valor es la mitad en el coágulo final.

La Figura 3 muestra la producción de fosfatasa alcalina durante 30 minutos para células similares a osteoblasto humanas (SaOS-2) que crecen en coágulos que contienen estroncio. Los valores citados son las concentraciones en el coágulo final. Para alcanzar esta concentración en el amortiguador se dobla.

La Figura 4 muestra el análisis turbidimétrico de coágulos donde el amortiguador trombina se comprende de un calcio, una mezcla de calcio/estroncio o estroncio solo. La anotación utilizada es Ca/Sr. Los valores citados son las concentraciones en el amortiguador. Este valor es la mitad en el coágulo final.

La Figura 5 muestra el porcentaje de supervivencia (cuando se mide por El ensayo de proliferación MTS) para coágulos que crecen en medio que contiene 12.5mM Sr o Ca.

La Figura 6 muestra el teñido de células NHOst cultivadas en coágulos de fibrina y coágulos de fibrina que contienen partículas de estroncio., Teñido Vivo (panel izquierdo) Muerto (panel derecho) de células NHOst cultivadas en coágulos de fibrina durante 14 días (panel superior) o coágulos de fibrina que contienen partículas de estroncio (panel de fondo).

La Figura 7 muestra las secciones transversales de coágulos de fibrina cultivados con células NHOst. Las células se tiñen de verde (Vivas) y rojo (Muertas). Coágulo fibrina superior. Coágulos de fibrina de fondo que contienen partículas.

La Figura 8 muestra una representación gráfica de agujeros de perforación

completamente cerrados (ambos lados se cierran).

La Figura 9 muestra el μ CT de un cóndilo femoral de conejo en la presencia de fibrina en el material.

5

La Figura 10 muestra la representación gráfica de formación ósea (evaluación: 1: bajo; 2: medio; 3: alta formación ósea).

10

La Figura 11 muestra μ CT de un cóndilo femoral de conejo con 80% de Sr material.

La Figura 12 muestra una sección delgada de tñido histológico de un defecto de cóndilo femoral de conejo tratado con Fibrina.

15

La Figura 13 muestra una sección delgada de tñido histológico de un defecto de cóndilo femoral de conejo tratado con Sr 80% en un coágulo fibrina.

La Figura 14 muestra la Influencia de SrCl_2 en bioactividad PTH.

20 Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se dirige a una trombina, composición fibrina y/o estroncio en una forma insoluble o soluble y/o un particulado inorgánico que puede o no puede contener estroncio y/o un plastificante fibrina para uso en cicatrización ósea y regeneración ósea. La alteración de las cantidades de trombina, o el contenido particulado inorgánico, permite el control del periodo de gelación como lo dicta la aplicación o el tejido objetivo. Un plastificante fibrina o agente modificante se puede utilizar para mejorar las propiedades mecánicas de la

25

formulación o para retrasar adicionalmente el tiempo de coagulación. Ejemplos de plastificantes incluyen agentes de contraste que contienen yodo tal como diatrizoato, yodecol, yodixanol, yofratol, yogulamida, yohexol, yomeprol, yopamidol, yopromide, yotrol, yoversol, yoxagulato y metrizamida y sus mezclas y

5 alcoholes polivalentes.

La composición se puede suministrar como un líquido antes de o durante la fase de gelificación o como un gel preformado en los defectos del tejido utilizando una técnica mínimamente invasiva. Se pretende que la formulación se reabsorba y

10 remplace con el tejido durante el proceso de cicatrización.

La solución de fibrinógeno es una solución acuosa con fibrinógeno que varía de 5-200 mg/ml, preferiblemente en el rango 50-100 mg/ml. La solución de fibrinógeno también puede incluir proteínas de matriz extracelular (por ejemplo,

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

El componente trombina, puede comprender adicionalmente los

20 compuestos adicionales conocidos en la técnica así como también el compuesto estroncio. No existe limitación específica con respecto a la cantidad de trombina utilizada. En un ejemplo de la presente invención, la cantidad de trombina en dicho componente de trombina (b) es tal que este es por lo menos aproximadamente 1 IU/ml en la composición final coagulada hasta la cantidad de 30 IU/ml.

25

En lugar de o en adición a la trombina de la presente invención otro agente induce gelación u otro agente induce coagulación para el componente (a), tal como protamina, veneno de serpiente, transglutaminasas, FXIIa, un sistema de

amortiguador alcalino fisiológicamente aceptable.

El amortiguador trombina es una solución acuosa que contiene entre otras sustancias un catión divalente. La concentración de catión divalente en el amortiguador puede variar de 5-50 mM. Preferiblemente los cationes divalentes se seleccionan de los grupos calcio y estroncio y la relación puede ser de 0: 1 a 0.975:0.025. Se pueden agregar iones de estroncio divalentes en la forma de cloruro de estroncio o cualquier otra sal de estroncio soluble en agua tal como ranelato de estroncio, glutamato de estroncio, aspartato de estroncio, malonato de estroncio, maleato de estroncio, ascorbato de estroncio, treonato de estroncio, lactato de estroncio, piruvato de estroncio, alfa-quetoglutarato de estroncio o succinato de estroncio. El amortiguador trombina también puede contener co-ligandos para un objetivo molecular identificado recientemente de estroncio (un receptor sensible-receptor de calcio acoplado a la proteína G, Pi et al, J. Biol. Chem. 2005). Los co-ligandos se seleccionan de los grupos calcimiméticos, osteocalcina y aminoácidos. Preferiblemente L-arginina, arginomiméticos o análogos arginina. El estroncio que contiene el amortiguador trombina también se puede utilizar en conjunto con el estroncio que contiene partículas inorgánicas.

El componente particulado tiene un diámetro de tamaño de partículas en el rango de nano a menos de 3000 μm . y debe ser insoluble al momento de aplicación. Preferiblemente, el tamaño de partícula está entre 100 nanómetros a 50 milímetros y más preferiblemente entre 0.5mm a 50 mm. Las partículas pueden ser cualquier quelato de estroncio que es insoluble al momento de aplicación o estroncio sustituido con sales de calcio que también son insolubles al momento de aplicación. La sal de calcio para sustitución se puede seleccionar del grupo que consiste de fosfato de calcio, trifosfato de calcio, alfa-trifosfato de calcio, beta-trifosfato de calcio, polimorfos de fosfato de calcio, hidroxiapatita, carbonato de

calcio, sulfato de calcio y sus combinaciones. La sustitución de estroncio de calcio de las partículas puede variar de 0.25-100 %. Mezclar para obtener el gel se puede alcanzar sobre un rango de temperaturas 18-37° C, preferiblemente 37° C.

- 5 La solución de fibrinógeno es una solución acuosa con fibrinógeno que varía de 5-200 mg/ml, preferiblemente en el rango 50-100 mg/ml. La solución de fibrinógeno también puede incluir monómero fibrina, derivados y fibrina I. La solución de fibrinógeno también puede incluir proteínas de matriz extra-celulares, por ejemplo fibronectina, proteínas asociadas a células, y otras proteínas
- 10 derivadas de plasma tal como factor XIII de coagulación sanguínea (FXIII) y proteasas.

- La solución trombina⁺ es una solución acuosa con una concentración mínima final de 0.1 IU/ml en la composición coagulada final (o gelificada). Esta solución
- 15 también se puede amortiguar y contener aminoácidos, proteínas o aditivos (por ejemplo L-arginina, manitol y albumina). El amortiguador trombina es una solución acuosa que contiene entre otras sustancias un catión divalente. La concentración de catión divalente en el amortiguador puede variar de 5-50 mM. Preferiblemente los cationes divalentes se seleccionan de los grupos calcio y estroncio y la relación
- 20 molar (puede ser de 1:0 a 0.975:0.025 de calcio a estroncio).

- Las partículas pueden ser cualquier quelato de estroncio que es insoluble al momento de aplicación o estroncio sustituido con calcio sales que también son insolubles al momento de aplicación. La sal de calcio para sustitución puede ser
- 25 fosfato de calcio, trifosfato de calcio, alfa-trifosfato de calcio, beta-trifosfato de calcio, un polimorfo de fosfato de calcio, hidroxapatita, carbonato de calcio, sulfato de calcio y sus combinaciones. La sustitución de estroncio de las partículas puede variar de 0.25-100 % como una relación de las partículas sustituidas.

El contenido de partícula en la composición varía de 2-100 % preferiblemente 30-50 % (peso/volumen) de proteínas coaguladas. El componente particulado tiene un diámetro de tamaño de partícula en el rango de sub-micrón a 5 menos de 3000 μm , como la aplicación lo requiere. La homogenización para obtener el gel final se puede alcanzar durante un rango de temperaturas 18-37° C, preferiblemente 37° C.

La eficacia de las composiciones de la presente invención para ayudar en la 10 reparación ósea se puede mejorar adicionalmente al incorporar moléculas bioactivas. Estas se pueden adherir químicamente a la matriz, adsorber en el componente particulado o atrapado en la matriz fibrina como una molécula libre o como un polvo de fármaco. Estas moléculas se pueden utilizar para estimular el metabolismo óseo (anabolismo y o catabolismo). Moléculas adecuadas que se 15 han identificado incluyen proteínas morfogénicas óseas (BMP), hormona paratiroide (PTH), calcitonina, bisfosfonatos, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento similar a insulina y los factores de crecimiento de la superfamilia TGF. Las moléculas adecuadas también pueden incluir otros factores no relacionados con el ciclo de anabolismo/catabolismo óseo pero se relacionan 20 con los procesos fisiológicos que ocurren en paralelo a la reparación ósea/remodelación tal como estimuladores angiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y también se pueden incorporar factores de crecimientos derivados de plaqueta [PDGF]. Esto es de particular interés cuando el modo de acción del estroncio se considera que está separado de los agentes 25 anabólicos 1,25(OH) vitamina D y paratiroide.

Un plastificante también se puede mezclar con la fibrina o trombina para mejorar las propiedades mecánicas de la formulación o para retrasar

adicionalmente el tiempo de coagulación. Ejemplos de plastificantes se seleccionan del grupo que consiste de agentes de contraste solubles en agua que contienen yodo, polietilenglicoles, alcoholes polivalentes tal como glicerol, mono-, di-, tri- y polisacáridos, y cualquier combinación de los mismos. Medios de
5 contraste que contienen yodo adecuados se detallan en la Solicitud de patente Estadounidense número US 20050119746 (Lidgren y Nilson, 2004), que se incorpora aquí como referencia, ejemplos de los cuales son diatrizoato (meglumina), yodecol, yodixanol, yofratol, yogulamida, yohexol, yomeprol, yopamidol, yopromide, yotrol, yoversol, yoxaglato y metrizamida. Preferiblemente
10 el agente de contraste es no iónico, tiene una baja osmolalidad y permite que ocurra el ensamble de fibrina por ejemplo yodixanol.

Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en métodos de cicatrización ósea útiles y en equipos para uso en tales métodos. Se contempla
15 que la composición se puede utilizar para promover el crecimiento óseo o cicatrización especialmente en huesos largos. Específicamente, la presente invención se relaciona con una composición de reparación ósea que contiene trombina, fibrina y estroncio. La presencia de estroncio en la composición conduce a la cicatrización ósea mejorada y o regeneración ósea cuando se compara con tal
20 una composición que no contiene estroncio.

Las composiciones de la invención se pueden utilizar para reparar y regenerar huesos largos tal como el fémur, tibia, húmero, radio y similares.

25 Utilizando las composiciones de la presente invención será posible realmacenar o parcialmente realmacenar la competencia estructural, arquitectónica y mecánica para huesos que tienen defectos, mientras se proporciona áreas de superficie estructurales, que pueden servir como sustratos

apropiados para los procesos biológicos que gobiernan la cicatrización y regeneración ósea. Como se muestra en los ejemplos, la composición de la invención acelera los procesos celulares y biológicos involucrados en la reparación ósea.

5

Como se utiliza aquí después la frase "hueso largo" se refiere a un hueso que tiene una longitud, que es por lo menos dos veces mayor que el diámetro. Típicamente, la frase "long hueso" se refiere a los huesos de las extremidades, es decir la tibia, peroné, fémur, húmero, radio, cúbito, carpio, metacarpo, falanges, tarso y metatarso. Más específicamente, la frase "hueso largo", como se utiliza aquí, se refiere a los cuatro huesos principales de las extremidades, es decir, la tibia, el fémur, el húmero y el radio.

El "defecto óseo" que se puede remediar por el uso de las composiciones de la presente invención puede ser cualquier anomalía en el hueso, que incluye, pero no se limita a, un vacío, una cavidad, una discontinuidad de conformación, una fractura o cualquier cambio estructural producido por lesión, osteotomía, cirugía, fracturas, cicatrización malformada, fracturas sin unión, deformaciones esqueléticas, envejecimiento, o enfermedad. Las composiciones de la presente invención proporcionan potencial terapéutico significativo. Cuando el hueso esponjoso viene de la enfermedad, por ejemplo, debido a la osteoporosis, necrosis avascular, o cáncer, el hueso cortical circundante llega a ser más propensa a fractura de compresión o colapso. Esto es debido a que el hueso trabecular no es más largo lo que proporciona soporte interior para el hueso cortical circundante. Las composiciones de la invención se pueden utilizar en el fortalecimiento del hueso en afecciones tal como osteoporosis, osteonecrosis o necrosis avascular así como también otra enfermedad ósea que involucra hueso infectado, pobre cicatrización ósea, o fractura de hueso por trauma severo.

Otro aspecto de la invención proporciona un equipo para reparar un hueso que tiene un defecto. El equipo incluye un dispositivo de fijación mecánico para fijar el hueso o sus porciones y composiciones de la presente invención. Ejemplos de un dispositivo de fijación incluyen, pero no se limitan a, abrazaderas, varillas, barras, cables, grapas, tornillos, suturas así como también varios moldes, manguitos y similares, que son típicamente dispositivos de fijación externos. De hecho, el equipo de la presente invención preferiblemente incluye un dispositivo de fijación mecánico externo.

10

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar defectos óseos, tal como fractura, vacíos en cavidades y similares que comprende ponerlos en contacto con una composición de la presente invención. En algunas modalidades, el método puede involucrar fijar mecánicamente el hueso o sus porciones antes de, o luego de una etapa de poner en contacto el defecto con una composición de la presente invención.

15

Ventajosamente, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar como composiciones inyectables que se suministran en un defecto óseo (hueso) o vacío o en el espacio de médula del tejido del hueso trabecular en donde la composición reemplaza temporalmente la médula ósea, y/o ayuda en la formación del nuevo hueso. Las composiciones se pueden inyectar en el tejido óseo trabecular o cualquier otro tejido óseo utilizando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en el arte. Tales técnicas de ejemplo y aparatos para desarrollar tales técnicas se discuten en por ejemplo, Publicación de Patente Estadounidense No. 20080065091, Publicación de Patente Estadounidense No. 20080058828, Publicación de Patente Estadounidense No. 20070073307, Patente Estadounidense Nos. 4,969,888 y 5,108,404 entre otras (cada uno de estos

20

25

documentos de patente se incorporan aquí como referencia). Típicamente, los dispositivos de inyección similares a una pistola calefateadora doméstica se utilizan para inyectar las composiciones en el hueso. Un dispositivo de inyección de cemento al hueso típico tiene un cuerpo en forma de pistola, que soporta un cartucho que contiene cemento óseo. Un disparador acciona un émbolo cargado con un resorte, que empuja un volumen de cemento óseo en una condición viscosa a través de una boquilla adecuada y en el interior de un hueso objetivo para tratamiento. De acuerdo con las Enseñanzas de la Patente Estadounidense. Nos. 4,969,888 y 5,108,404, una cavidad se puede formar primero al compactar el hueso trabecular dentro del hueso, en el que se inyecta el cemento óseo.

Una ventaja adicionada de incorporación del Sr en las composiciones inyectables de la invención es que este permite el suministro y proceso de cicatrización para se monitoreado utilizando una técnica tal como fluoroscopia debido a las propiedades conocidas del estroncio como un radio-opacificador. Como tal, el uso del Sr en las composiciones de la presente invención proporciona una función terapéutica y diagnóstica y no simplemente una función de formación de imagen sola.

Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en la forma de un gel inyectable, una pasta inyectable, una pasta, una masilla, o una forma secada por congelamiento rehidratable. Como se utiliza aquí, el término "gel" se refiere a una sustancia líquida parcialmente suave, espesa como gelatina. Un gel de la presente invención se puede extruir en por lo menos una guja para jeringa de diámetro 13. "Pasta," como se utiliza en la presente solicitud se refiere a una sustancia húmeda, suave que tiene una consistencia entre un líquido y un sólido. Una pasta de la presente invención es menos sólida que una masilla y más sólida que un gel, y en algunas modalidades puede ser inyectable.

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

"Inyectable" se refiere a la capacidad de la presente invención para ser introducida en un sitio de implante bajo presión (mediante introducción utilizando una jeringa). Una composición inyectable de la presente invención, por ejemplo, se puede introducir entre los elementos o en un espacio confinado in vivo (es decir, entre piezas de hueso o en la interface entre un dispositivo protético y hueso, entre otros).

"Jeringa" se refiere a cualquier dispositivo que se puede utilizar para inyectar o retirar la composición de reparación de tejido fluible de la presente invención, que incluyen ciertos geles y pastas, entre otros.

La composición se inyecta en el hueso cortical o el hueso trabecular de un sujeto (preferiblemente, el sujeto es un humano, simio, ovino, bovino, equino, porcino), "hueso cortical," como se utiliza en la presente solicitud, se refiere al hueso compacto del eje de un hueso que circunda la cavidad medular. El hueso cortical es una estructura altamente densa hecha de hebras de hélice triple de fibras de colágeno, reforzada con hidroxiapatita. El hueso cortical es una estructura de compuesto y es la carga principal que lleva el componente de huesos largos en el cuerpo humano. El componente hidroxiapatita es responsable de la alta resistencia compresiva del hueso mientras que el componente de fibra de colágeno contribuye en parte a resistencia torsional y tensil. Las composiciones de la invención se pueden introducir en tales partes de hueso para impartir una

cicatrización ósea benéfica o efecto de aumento óseo.

El hueso trabecular es de composición similar al hueso cortical y es el componente estructural principal de "hueso esponjoso" y se refiere un hueso de adulto que
5 consiste de fibras de colágeno paralelas ordenadas regularmente mineralizadas organizadas de forma diferente en el hueso lamelar del eje de huesos largos de adulto. El hueso esponjoso se encuentra generalmente en el extremo de los huesos largos circundados por el hueso cortical. El hueso esponjoso tiene espículas que forman una red, con intersticios llenos con la médula ósea. Esto
10 también se puede referir como un hueso trabecular, o hueso esponjoso. En modalidades preferidas, las composiciones de la invención se suministran en el hueso trabecular.

Los métodos de fijación del hueso de la invención también pueden incluir la
15 etapa de dar forma nuevamente al defecto antes de fijar el hueso o poner en contacto con la composición de la invención. Tal como dar forma nuevamente o la alineación del hueso se puede desarrollar con, por ejemplo, taladros o esmeriladores o cualquier otro dispositivo utilizable para dar forma nuevamente al defecto.

20

El dispositivo utilizado para fijar el hueso dependerá del tipo de defecto a ser reparado y en el tipo y sitio del hueso. Típicamente, el dispositivo de fijación es un dispositivo de fijación externo. Preferiblemente, un dispositivo de fijación externo tal como, por ejemplo, un molde, es el dispositivo de fijación único
25 utilizado en el método de la presente invención, acompañado con una inyección de la composición de la presente invención. Sin embargo, en algunas circunstancias puede ser necesario emplear procedimientos quirúrgicos más invasivos utilizando un dispositivo de fijación interno que se puede utilizar bien. Se

puede monitorear la reparación y en el curso debido el dispositivo empleado para fijar el hueso se puede remover. La regeneración ósea en el sitio del defecto se puede evaluar mediante rayos X del tejido blando (7.5 mA; 0.5 seg) tomados inmediatamente después de la cirugía y en intervalos de tiempo dados postcirugía.

- 5 La regeneración ósea en animales de prueba también se puede determinar luego de la terminación de los experimentos al evaluar la morfología general, exploración de topografía computerizada (CT) (65-80 kV; 20 seg) y exploración tres veces dimensional (3-D) CT (Marconi, M.times.8,000). Se pueden desarrollar estudios histológicos para determinar el teñido del hueso del tejido.

10

- En los métodos de la invención, las composiciones también se pueden combinar con células que se pueden utilizar en la reparación ósea, tal como por ejemplo, células osteoprogenitoras. Las células osteoprogenitoras, como se conoce en la técnica, incluyen una subpoblación osteogénica de las células
- 15 estromales de médula, caracterizado como células formadoras de hueso. Las células osteoprogenitoras utilizadas por el método de la presente invención pueden incluir células que forman hueso osteogénicas per se y/o células madre embrionarias que forman células osteoprogenitoras. Las células osteoprogenitoras se pueden aislar utilizando procedimientos conocidos. Tales células son
- 20 preferiblemente de una fuente autológica e incluyen, por ejemplo, células madre embrionarias humanas, células osteoprogenitoras de murino o humano, células derivadas de médula osteoprogenitoras de murino o humano, células derivadas de embrión osteoprogenitoras de murino o humano y células embrionarias de murino o humano. Estas células pueden servir adicionalmente como células que secretan
- 25 factores de crecimiento, como se describe por Robinson y Nevo (2001), que se definieron aquí anteriormente.

La composición de la presente invención también puede comprender

adicionalmente varios agentes terapéuticamente activos, que pueden incluir agentes que promueven el crecimiento óseo, células osteoprogenitoras o una combinación de estos. Las composiciones pueden incluir por lo menos un fármaco, tal como, una vitamina, un antibiótico, un agente anti-inflamatorio y
5 similares.

En ciertas modalidades preferidas, el estroncio incorporado en la sal que contiene calcio utilizando técnicas conocidas por aquellos expertos en el arte para preparar compuestos de calcio sustituidos por estroncio. Adicionalmente, el
10 estroncio se puede incorporar en cristales bioactivos que se utilizan convencionalmente en la reparación del tejido. Un "cristal bioactivo" es cualquier cristal que exhibe características de bioactividad, esto es típicamente y un sólido amorfo que no es intrínsecamente adhesivo y que es capaz de formar un enlace cohesivo con tejido blando y duro cuando se expone a ambientes in vivo e in vitro
15 apropiadas, tal como fluido corporal simulado o amortiguadores tris-hidroximetilaminometano. Un enlace cohesivo se logra al desarrollar una capa de superficie de hidroxicarbonato apatita en el cristal bioactivo a través de la liberación de especies iónicas de la masa del material biocristal. Existen numerosas aplicaciones para cristales bioactivos en el campo de los tratamientos
20 quirúrgicos y ortopédicos así como también en cirugía dental y se han descrito, por ejemplo, en la Patente Europea 1 405 647 y Solicitud de Patente Europea 1 655 042, así como también en Solicitudes Internacionales WO 96/21628, WO 91/17777, WO 91/12032 y Publicación de Patente Estadounidense número 20080066495 (cada una se incorpora aquí como referencia).

25

Ejemplos:

En una realización de la invención, el compuesto que contiene estroncio se

utiliza como el ión divalente en un amortiguador de dilución trombina. La solución trombina se prepara utilizando el amortiguador de dilución. La solución de fibrinógeno y la solución trombina que contiene se mezclan para formar un gel. En otra modalidad de la invención, el compuesto que contiene estroncio se agrega a la formulación como una partícula de sal. La solución trombina y las partículas se mezclan para preparar la solución trombina modificada. La solución de fibrinógeno y la solución trombina modificada se mezclan para formar un gel.

Ejemplo I: Compuesto que contiene estroncio Disuelto en la Solución de amortiguador.

Se prepara una serie de amortiguadores en agua doblemente destilada. Para estos amortiguadores, el catión divalente en el amortiguador trombina es Ca o una mezcla de Ca + Sr de tal manera que la concentración de catión se mantiene constante a 40 mM (ver tabla adelante para cloruro de estroncio). La trombina se diluye con una concentración de 4IU en el amortiguador trombina.

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

El fibrinógeno luego se mezcla con trombina en una relación 1:1 (por lo tanto la concentración de estroncio en el coagulo gelificado es la mitad). Por esto, 2 ml de la solución trombina se puede transferir a una jeringa de 5ml. Se transfiere 2 ml de fibrinógeno (Tisseel, Baxter, Clottable Protein, [fibrinógeno y fibronectina] 72-110 mg/ml) en una jeringa separada de 5ml. Las jeringas que contienen el fibrinógeno y la trombina se pueden conectar en cualquier estado al mezclador de la técnica con el propósito de combinar.

Para experimentos in-vitro, los coágulos se preparan mediante pipeta de 150 μ l de la solución de fibrinógeno a los pozos de una placa de 24 pozos. La placa se pone en agitador de placa para asegurar aún una distribución sobre el fondo del pozo. Luego se agrega 150 μ l de la solución trombina al pozo y la placa se pone en un agitador de placa para asegurar coágulos homogéneos. Una estirpe celular similar a osteoblasto humano (SaoS-2) se cultiva en los coágulos durante hasta 7 días para ver si se pueden observar diferencias en la proliferación celular/diferenciación celular. La Figura 1 muestra los resultados para proliferación (Alamar Blue) cuando el cloruro de estroncio (SrCl₂) se agrega al amortiguador de dilución trombina. Están disponibles resultados similares para Acetato de estroncio (SrAc).

El ensayo Alamar Blue es un ensayo metabólico y se utiliza frecuentemente para medir la proliferación. La adición de estroncio resulta en proliferación significativamente incrementada en estos coágulos cuando se compara con un coágulo normal con 20mM CaCl₂. Un resultado similar también se observa cuando la proliferación se cuantifica utilizando una cepa de ADN (Figura 2). Después de 7 días, se pueden observar claras diferencias entre las células que crecen en coágulos que contienen una mezcla de estroncio y calcio o solo calcio. Así concluimos que el estroncio tiene un efecto positivo en la proliferación de células SaOS-2 similares a osteoblasto.

Estos experimentos iniciales se diseñan para observar diferencias en la proliferación celular lo que no proporciona suficiente tiempo para investigar la diferenciación del osteoblasto. La enzima de fosfatasa alcalina es un indicador temprano de diferenciación pero realmente no se alcanzan los niveles pico sino hasta aproximadamente los días 10-14. Un resultado preliminar muestra un incremento en la expresión de fosfatasa alcalina en coágulos que contienen

estroncio (Figura 3). En el caso de acetato de estroncio estos valores parecen no ser significativos. Estos experimentos se han repetido con un periodo investigativo de 14 días.

5 En adición a la observación de estudios celulares, se lleva a cabo análisis turbidimétrico para examinar si la estructura de coágulo se altera como un resultado del estroncio (Figura 4) La turbidez del coágulo es directamente proporcional al área de sección cruzada promedio de las fibras, por lo tanto el coágulo más turbio es mayor que el diámetro de fibra.

10

Los datos de turbidimetría en la Figura 4 muestran que existe muy poca diferencia en las cinéticas y la absorbancia para coágulos que contienen estroncio en comparación con coágulos que contienen calcio. Esto se puede explicar por las observaciones que el calcio y estroncio son capaces de ocupar sitios de unión
15 similares, en particular el sitio de unión FXIII.

20

25

Para los experimentos iniciales, se siembran células en la superficie de los coágulos. Una de las razones para seleccionar este método de siembra es que algunos tipos de células cuando se siembran dentro de los coágulos sufren más de muerte celular y existe migración de las células a la superficie del coágulo. Una explicación posible para este efecto se puede explicar cuando se cultiva células similares a osteoblasto en un medio complementado con CaCl_2 . La Figura 5 muestra el resultado del cultivo SaOS-2 en el plástico del cultivo de tejido en la presencia de 12.5 mM de Muerte Celular CaCt (cuando se mide por un ensayo MTS) que ocurre para las células cultivadas en la presencia del cloruro de calcio. Esto ocurre dentro de las primeras 24 horas del cultivo celular. En contraste existe solo una ligera reducción en la proliferación de células cultivadas en la presencia de compuestos que contienen estroncio. Es importante aclarar que algunas

células tienen un requerimiento para alto calcio es decir, fibroblastos y queratinocitos, y así no afectaría la concentración de calcio del coágulo.

Ejemplo 2: Nanopartículas de Fosfato de Calcio Dopadas con Fibrina/Estroncio

5

Se diluye trombina en una concentración de 4 IU en el amortiguador trombina. Se mezcla el fibrinógeno con trombina en una relación 1:1. Para esto se puede transferir 2 ml de la solución trombina a una jeringa de 5ml. Se transfieren 2 ml de fibrinógeno (Tisseel, Baxter, Clottable Protein, [fibrinógeno y fibronectina] 10 72-110 mg/ml) en una jeringa separada de 5ml. Se incorporan partículas (nanopartículas menores de 1 μ m) como un porcentaje peso del volumen de coágulo final ((p/v). Estos se pesan y se colocan en otra jeringa de 5ml.

Las jeringas que contienen las partículas y la trombina se conectan por vía 15 de un adaptador Luer y la trombina y las partículas homogenizadas al transferir los contenidos de jeringa a jeringa. Las jeringas que contienen la trombina/partículas y EL fibrinógeno se conectan por vía de un adaptador Luer y los contenidos se homogenizan. El material permanece líquido durante aproximadamente 30 segundos durante este tiempo se puede inyectar en el defecto.

20

Para experimentos in vitro, los coágulos se preparan mediante pipeta de 150 μ l de la solución de fibrinógeno a los pozos de una placa de 24 pozos. Las partículas (nanopartículas menores de 1 μ m) se agregan como porcentaje en peso del volumen de coágulo final (p/v). La placa se pone en agitador de placa para 25 asegurar aún distribución sobre el fondo del pozo. Luego se agrega 150 μ l de la solución trombina al pozo y la placa se pone en agitador de placa para asegurar coágulos homogéneos. En los estudios preliminares, se cultiva una célula similar a osteoblasto humano (SaOS-2 o NHOst) en los coágulos durante hasta 14 días

para ver si se pueden observar cualesquier diferencias en la proliferación celular, diferenciación celular.

El análisis cuantitativo para las células sembradas en los coágulos que
5 contienen partículas muestra buena biocompatibilidad, cuando se compara con
coágulos de fibrina normales (Figura 6). Aunque no se cuantifica, parece que las
células en los coágulos de fibrina sin partículas son más redondas en morfología
mientras que aquellos en la partícula contienen coágulos que son más esparcidos.
Se puede ver evidencia adicional de esto en las secciones transversales de los
10 coágulos (Figura 7). Para esto, se siembran células en los coágulos. Después de
unos pocos días las células en los coágulos de fibrina han migrado a la superficie
del coágulo. Por comparación, las células en los coágulos que contienen
partículas permanecen en los coágulos y se han esparcido mostrando una
morfología favorable.

15

Ejemplo 3: Uso de Hidroxiapatita Dopada con Estroncio En Modelo de Defecto de Cóndilo Femoral de Conejo

Los estudios descritos anteriormente sugieren que el estroncio estimula la
20 formación ósea y al mismo tiempo reprime la resorción ósea. Estudios previos
investigan el efecto del SrC12 en células similares a osteoblasto y en osteoblastos
principales. En el curso del intento para identificar una formulación que se puede
utilizar en el aumento vertebral, una hidroxiapatita modificada que se dopa con
estroncio, se prueba en un modelo de defecto de cóndilo femoral de conejo para
25 evaluar el potencial del estroncio para estimular la formación ósea. Se puede
producir hidroxiapatita de calcio en el banco al agitar nitrato de calcio y fosfato de
amonio junto a un alto valor de pH (ajustado con hidróxido de amonio). El
precipitado resultante se puede centrifugar, lavar, secar y calcinar para obtener

una sustancia similar a hidroxiapatita. Al combinar el nitrato de calcio con nitrato de estroncio nitrato en el porcentaje respectivo de sustitución es posible para producir partículas similares a estroncio- hidroxiapatita de calcio que se pueden inyectar juntas con fibrina en un defecto óseo.

5

Este ejemplo muestra los datos que muestran que las partículas similares a hidroxiapatita de calcio sustituidas con estroncio estimulan nueva formación ósea mejor que la fibrina sola o partículas similares hidroxiapatita de calcio puras. Estos resultados proporcionan corroboración in vivo de los datos obtenidos durante

10 cultivo celular preliminar.

Materiales y Métodos:

Se utilizan los siguientes reactivos químicos en los estudios descritos en el

15 ejemplo actual. Tetrahidrato de nitrato de calcio; 99% reactivo A.C.S. [Sigma-Aldrich; 237124-500G; FW: 236,15]; Nitrato de estroncio p.A. >99% [Fluka; 85899 500g; Lot&Rellenar código: 1086321, 53706181; FW: 211,63]; Fosfato de amonio bifásico p.A. [Riedel-de Haen; 30402 500g; FW: 132,06] ; hidróxido de amonio [Sigma-Aldrich, 318612-2L; tanda#: 11103PD; FW: 35,05; 5N en H₂O]; EtOh 96%;

20 Fibrinkleber [Baxter AG; Fibrinkleber TIM 3; 08P6004H; 5ml; 1500434]; Trombina [Baxter AG; B205553 thromb. SD TIM 5; 500IE; US 5ml]; Dihidrato de cloruro de calcio (min. 99%) [Sigma; C7902-1KG; tanda#: 044K0160]; y Cloruro de sodio [Merck, 1.06404.1000 lkg; Carga/Lote: K38062004 745; FW: 58,44.

25

Los experimentos emplean varias soluciones como sigue: 40mM CaCl₂+200mM NaCl: 1.47g CaCl₂ + 2.92g NaCl en 250ml ddH₂O; reconstituyente trombina liofilizado en 5ml 40mM CaCl₂+200mM NaCl y reconstituyente fibrinógeno liofilizado en 5ml de 3000 KIE/ml Aprotinina.

Se desarrollan experimentos en grupos de 4 pruebas con Rodillas de 6 conejos cada uno como sigue:

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

Preparación de Materiales de prueba:

- 15 Se reconstituye fibrinógeno y se forma alícuotas en jeringas de 1ml [Braun; omifix – 1ml; Luer] con 0.5ml de fibrinógeno por jeringa. Se reconstituye trombina y se diluye con 40mM CaCl_2 + 200mM NaCl a 16 IU/ml. Esto también se forma en alícuotas con jeringas de 1ml, 0.5ml por jeringa. Los polvos de hidroxiapatita se producen al agitar juntos volúmenes iguales de 2M de solución de nitrato de calcio
- 20 (o de acuerdo con el porcentaje de sustitución de estroncio también de nitrato de estroncio, la solución resultante tiene que tener 2M en total) y 1.2M de solución de fosfato de amonio. Luego de la adición de fosfato de amonio al nitrato de calcio se precipita una sustancia pastosa. Una adición posterior de un volumen igual de hidróxido de amonio eleva el pH del precipitado a 11 y hace el líquido precipitado
- 25 masilla. Después de agitar la mezcla se centrifuga, el sobrenadante se descarga y el precipitado se lava dos veces con alcohol (etanol 96%) y una vez con ddH₂O. Entre las etapas de lavado el precipitado siempre se elutria, se centrifuga y se descarga el sobrenadante. Después de esto el precipitado se seca a 60 °C bajo

vacío duran un día, se muele y se calcina durante 1 hora a 1100 °C.

Después de enfriar las partículas similares a hidroxiapatita se esterilizan con calor y se dividen en alícuotas en jeringas de 1ml, 0.3g por jeringa.

5

Tratamiento de los conejos

Se utilizan 12 conejos para desarrollar el experimento principal. Ellos se sedan y se perfora un agujero (4.5mm de diámetro) en los cóndilos femorales. Estos agujeros de perforación se llenan cada uno con uno de los materiales de prueba al sacudir el componente trombina con partículas y después de esto con fibrinógeno, o trombina con fibrinógeno como un control. El cono de las jeringas de 1ml se fijan perfectamente en los agujeros de perforación, ya que es posible la aplicación directa.

15

Después de inyección del material respectivo (aleatorizado para las 24 rodillas) la piel se sutura y el conejo se mantiene monitoreado durante las siguientes 8 semanas.

20 **Análisis Post-operación**

Después de las 8 semanas a los conejos se les llega a practicar la eutanasia y las rodillas se analizan por μ CT y las secciones finas se tiñen histológicamente.

25

Resultados

Análisis μ CT: Debido a la alta opacidad de las muestras de estroncio es difícil

obtener resultados cuantitativos, ya que se hace el análisis semi-cuantitativo al evaluar las fotos μ CT con el ojo y cuantificarlos. La evaluación de la formación ósea se desarrolla en tres niveles (1: bajo; 2: medio; 3: alto). La evaluación de un agujero de perforación cerrado se hace al dar "+" para un agujero de perforación cerrado y un "-" para un agujero de perforación no cerrado. Los datos se muestran en las gráficas en las Figuras 8 a 14. Todas las gráficas son promedios evaluables de animales tratados, mientras que las fotos μ CT son instantáneas.

La Figura 8 muestra la representación gráfica de agujeros de perforación completamente cerrados (ambos lados se cierran). Ninguno de los defectos de cóndilo de conejo evaluados llenos con fibrina se cierran en ambos lados, por lo tanto el 0% de los límites de agujero de perforación completamente cerrados se ven en la Figura 8. La sustitución de 25% Sr en las partículas produce el valor mayor de 80% de los límites de agujero de perforación cerrados.

En la Figura 9, existe el μ CT de un cóndilo femoral de conejo en la presencia de fibrina. El defecto es todavía visible, pero sin material residual (fibrina) es visible; aún se abre un lado del agujero de perforación.

La adición de estroncio produce efectos marcados. La Figura 11 muestra μ CT de un cóndilo femoral de conejo en 80% de material Sr. Aunque el defecto es todavía visible, la mayoría del defecto se llena; el material (Sr80%) es fuertemente visible. La nueva formación ósea es claramente identificable y se cierran ambos lados del agujero de perforación.

También se confirman los anteriores resultados utilizando estudios histológicos. La Figura 12 muestra una sección fina de tñido histológico de un defecto de cóndilo femoral de conejo tratado con fibrina. No está presente la

sustancia de prueba. De acuerdo con lo anterior no se encuentran signos de inflamación. Solo un poco, se encuentran huesos esponjoso trabeculares dentro del agujero de perforación. En la abertura del canal del torno, la sustancia ósea recién formada es de forma esponjosa. Los vasos sanguíneos se distribuyen casi
5 regularmente dentro de la cavidad perforada, mostrando solo pocas manchas que son menos vascularizadas. Varios vasos sanguíneos más grandes están cerca de la vecindad de la sustancia ósea en un lado de la cavidad perforada.

En las muestras tratadas con 80% de estroncio en el coágulo de fibrina
10 (Figura 13), 40-70% del canal de perforación se llena con la sustancia de prueba. La sustancia de prueba está en todas las muestras de forma alongada dentro de la cavidad perforada. En una muestra esta es más granular, mientras que en la otra dos exhiben una sustancia de prueba más áspera. En 2 de 3 muestras está presente fibrina como parches grandes cercanos a la sustancia de prueba. Son
15 pocas las inflamaciones en una muestra, y varían de 3-10 inflamaciones grandes en los otros especímenes. En una muestra la sustancia de prueba está en contacto directo con el tejido óseo recién construido, aunque que reposa más distante de las otras dos. Dos muestras han distribuido regularmente los vasos sanguíneos dentro de la cavidad perforada, aunque la tercera tiene una
20 vascularización más agrupada.

Discusión

Los datos μ CT muestran que las formulaciones que contienen 25% Sr
25 sustituyen partículas similares a hidroxiapatita activa un cierre de un agujero de perforación mejor que las otras sustancias de prueba, que induce una formación ósea comparable de 80% de partículas sustituidas, aunque es menos denso.

La fibrina sola activa menos formación ósea y los agujeros de perforación se cierran solo en un lado. Las formulaciones que contienen partículas similares a hidroxiapatita de calcio puras no son tan densas, pero parecen no inducir la formación ósea o un cierre de los agujeros de perforación. La formulación de

5 concentración alta de estroncio es muy densa, este induce la nueva formación ósea, pero no significativamente más de 25% de Sr. Adicionalmente el cierre de agujero de perforación es peor comparado con Estroncio en una concentración inferior, así aún bajas concentraciones de estroncio es suficiente para inducir la formación ósea.

10

Los resultados histológicos sugieren que la sustitución de estroncio en partículas similares a hidroxiapatita de calcio induce la formación del nuevo hueso. La vascularización, un prerequisite para la inmigración de osteoblastos y por lo tanto la nueva formación ósea, se detecta en todas las muestras.

15

Ejemplo 4: El estroncio tiene un efecto sinérgico con PTH en células de osteoblasto.

El actual ejemplo describe estudios in vitro en células de osteosarcoma de

20 rata para investigar si una combinación de hormona paratiroide (PTH) y Estroncio (utilizado como SrC12) en la activación de factores de formación ósea similares a la producción cAMP incrementada en osteoblastos. Los estudios descritos aquí muestran que el SrC12 tiene un efecto sinérgico positivo con PTH en la generación de cAMP en células de osteoblasto. No se observa tal efecto para

25 células tratadas con CaCl_2 . Como el cAMP se conoce por inducir la formación ósea anabólica, los datos presentados aquí soportan una conclusión de una terapia de combinación de Sr y PTH que conducirá a la formación ósea incrementada in vivo.

Materiales y Métodos

La estirpe celular de osteosarcoma UMR- 106 (NewLab Bioquality AG,
5 Erkrath, Alemania) se utiliza para desarrollar el bioensayo.

Los ensayos descritos adelante utilizan los siguientes medios:

Medio de cultivo celular: DMEM (Sigma, D6546; incl. 4500mg/l Glucosa,
10 Na-Piruvato, Na₂CO₃, compl. con 0.584g/l L-glutamina); 10% FCS; 2mM L-Glu.

Medio de inanición: DMEM (Sigma, D6546; incl. 4500mg/l Glucosa, Na-
Piruvato, Na₂CO₃, compl. con 0.584g/l L-glutamina); 2mM L-Glu;

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

20 mM SrCl₂ en medio de inanición: 19,6 ml Medio 0,4 ml IM SrCl₂

20 mM CaCl₂ en medio de inanición 19,6 ml Medio 0,4 ml IM CaCl₂

20

Cultivo celular

Se siembran células UMR- 106 en medio de crecimiento en una densidad
de 30000 células/cm² y se incuban a 37°C/ 8.0% CO₂ Después de 24 horas, el
25 medio se intercambia con medio fresco, 20 mM de SrCl₂ que contiene medio o 20
mM CaCl₂ que contiene medio. Las células se incuban adicionalmente a 37°C/
8.0% CO₂ durante 24 horas. Las células se cosechan de acuerdo con el siguiente
procedimiento: las células se lavan dos veces con HBSS y se desunen de la

superficie utilizando 6ml de tripsina/EDTA durante 3min a temperatura ambiente. Se detiene la digestión de tripsina con 12ml de medio de crecimiento. Luego de centrifugación (3min, 1000rpm, RT) las células se resuspenden en 12ml de medio de inanición y se cuentan con un contador de células CASY. La velocidad de células muertas está por debajo de 10% en cada experimento. Se resuspenden células en una concentración final de 1.6×10^6 células/ml en medio de inanición. Se transfiere 50µl de la suspensión celular en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incuba durante 30min a 37°C, 8.0%CO₂.

10 **Tratamiento de células con 264 µg/ml de muestras TGpIPTH en solución de fibrinógeno**

Se diluyen muestras en medio de inanición frescamente preparado que contiene 2mM IBMX (medio SI). Para la preparación del medio SI 30 µl de 0.67M de solución madre IBMX en DMSO se agrega a 10 ml del medio de inanición.

Se preparan todas las diluciones de la muestra con este medio para inhibir la actividad fosfodiesterasa en células UMR-106 (Janik, P., 1980; Chasin M. y Harris, D.N., 1976). Se agregan 50µl de muestras diluidas (como se indica en los resultados) se agregan a las células después de 30min de incubación a 37°C. Para la producción de cAMP las células se incuban durante 1h a 37°C, 8.0%CO₂. Cada concentración de la muestra se agrega a las células por lo menos en duplicados luego de análisis cAMP en duplicados.

25 **Ensayo Inmune de Enzima cAMP Byotrak**

Preparación del reactivo para cAMP EIA. El amortiguador de ensayo, el reactivo de lisis 1A/1B, el reactivo de lisis 2A/2B, el estándar cAMP, antisuero,

conjugado de Peroxidasa cAMP y el amortiguador de lavado se preparan de acuerdo con el manual del fabricante (cAMP Byottrak EIA kit, GE Healthcare). Se prepara IM de ácido sulfúrico mediante la dilución de 53ml H₂SO₄ (conc.= 18.76M) con 947ml ddH₂O.

5

Lisis celular y dilución de cAMP Para la extracción de cAMP 100µl de PTH que contiene la suspensión celular se incuba con 25 µl (dilución final 1:5) disolvente de reactivo de lisis IA que es parte del equipo cAMP Byottrak EIA (GE Healthcare). Para la lisis total, se agitan células durante 15min a 500rpm a temperatura ambiente. El cAMP extraído se diluye finalmente 1:20 con reactivo de lisis IB (equipo cAMP Byottrak EIA) (1:1 dilución en la placa de ensayo (se agregan 125µl de reactivo de lisis IB) seguido por dilución 1: 10 en la placa ELISA (90µl del reactivo de lisis IB + 10µl de suspensión celular diluida).

15

Preparación de estándar de trabajo cAMP El estándar cAMP liofilizado para el ensayo no acetilado (empaquete cAMP Byottrak EIA) se resuelve en amortiguador de ensayo para obtener una concentración de 32pmol/ml. Una serie de dilución doble se prepara que varía de 32pmol/ml a 0.5pmol/ml.

20

Control interno. Se transfieren 100µl de cada estándar y dilución de muestra al pozo apropiado y se analizan en duplicados. Adicionalmente, dos controles internos diferentes, el control de unión no específico (NSB) y un control cero (0) es necesario para mostrar la especificidad del cAMP ELISA y se desarrollan como se recomienda por el fabricante (GE Healthcare).

25

Procedimiento de inmunoensayo de Enzima. Se agrega 100µl de antisuero a todos los pozos excepto el control NSB. Se desarrolla reacción de anticuerpo durante 2h a 4°C con agitación. Luego de incubación con 50µl de

conjugado de peroxidasa cAMP durante 1h a 4°C con agitación, todos los pozos se lavan cuatro veces con 300µl de amortiguador de ensayo. Finalmente, se agrega 150µl de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) a cada pozo y se permite la reacción del sustrato durante 10min a temperatura ambiente. La reacción se detiene al agregar 100µl IM H₂SO₄ y se determina la densidad óptica inmediatamente en un lector de placa a 450nm.

Análisis de datos. Se determina la densidad óptica en un lector de placa (Synergy HT) al medir la absorbancia de las muestras a 450nm utilizando el software KC4. Las correcciones antecedentes, cálculos de valores medios, desviaciones estándar, coeficientes de variación y generación de curvas estándar se desarrollan en Microsoft Excel 2000. Sigmaplot 9.0 se utiliza para curvas de 4-parámetros y cálculos EC50. PLAI.2 (Stegmann Systemberatung) se utiliza para Análisis de Línea Paralela y detección de la Potencia Relativa.

Porcentaje de conjugado de peroxidasa cAMP unido. El porcentaje de conjugado de peroxidasa cAMP unido para cada muestra y estándar se calcula utilizando la siguiente relación:

$$B/BO (\%) = \frac{(muestra\ OD - OD_{nsb}) \times 100}{(OD_{cero} - OD_{nsb})}$$

Muestra OD	OD450 de muestra específica
Cero OD	OD450 de cAMP conjugado con peroxidasa solo
OD nsb,	OD45G sin anticuerpo cAMP

Curva estándar. La curva estándar cAMP se genera al graficar el

porcentaje B/BO (eje y) como una función del log c(cAMP) (eje x).

Concentración cAMP de las muestras. Tomando en cuenta el factor de dilución (20x) las cantidades producidas cAMP se calculan utilizando los parámetros (pendiente e intercepto) de la curva estándar.

Linealidad. Se evalúa el coeficiente de correlación de la curva estándar del cAMP ELISA ($R > 0.95$).

Preparación de las Muestras de Análisis de Bioensayo. Para análisis, se diluyen muestras en medio de inanición que contiene 2mM de inhibidor fosfodiesterasa IBMX (medio Si) en una concentración final de 2400nM TGpIPTH (13,2 µg/ml TGpIPTH). Para todas las muestras se preparan 150µl de las siguientes 8 diluciones seriales y se agregan 50µl directamente a las células (volumen total en las células: 100µl). Para todas las muestras y todas las diluciones, se calculan los valores medios de OD450, las desviaciones estándar, las concentraciones de cAMP y los coeficientes de variaciones.

C(TGpIPTH) nM	Preparación	C(TGpIPTH) µg/ml
2400nM (1200nM en células)	Ver anterior	13,2
1200nM (600nM en células)	1:1 en medio de dilución	6,6
600nM (300nM en células)	1:1 en medio de dilución	3,3
300nM (150nM en células)	1:1 en medio de dilución	1,65
150nM (75nM en células)	1:1 en medio de dilución	0,83
75nM (38nM en células)	1:1 en medio de dilución	0,42
38nM (19nM en células)	1:1 en medio de dilución	0,21
19nM (10nM en células)	1:1 en medio de dilución	0,1

Tabla de Dilución Serial. Para la generación de una curva de respuesta de dosis se desarrollan siete etapas de dilución serial una a una para cada muestra y

se analizan todas las diluciones de triplicados.

Resultados

- 5 La influencia de SrCl_2 y CaCl_2 en bioactividad PTH se monitorea independientemente durante cinco experimentos diferentes (Figura 14). Estos estudios muestran que una preincubación de 24h de células UMR- 106 con 20mM SrCl_2 antes de tratamiento TgPIPTH conduce a bioactividad incrementada dos veces, aunque el CaCl_2 no muestra cambio en la bioactividad PTH (Figura 14).
- 10 Estos resultados indican que el estroncio y el PTH tienen un efecto sinérgico en la producción de cAMP y soportan la conclusión que una combinación de PTH y estroncio conduciría a formación ósea anabólica in vivo.

REIVINDICACIONES

Lo que reivindicamos es:

1. Una composición que comprende fibrina, trombina y un compuesto que
5 contiene estroncio para uso en cicatrización ósea o crecimiento óseo.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición está en
forma de un gel, masilla, pasta o líquido.
- 10 3. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende
adicionalmente un plastificante.
4. La composición de la reivindicación 3 en donde el plastificante es un
compuesto que contiene yodo.
- 15 5. La composición de la reivindicación 4 en donde el compuesto que contiene
yodo se selecciona del grupo que consiste de diatrizoato, yodecol,
yodixanol, yofratol, yogulamida, yohexol, yomeprol, yopamidol, yopromide,
yotrol, yoversol, yoxagulato y metrizamida y sus mezclas y alcoholes
20 polivalentes.
6. La composición de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, o 5 en donde la
composición se puede suministrar, como un líquido, pasta o un gel antes de
o durante la fase de gelificación o como un gel preformado, pasta o masilla
25 dentro de los defectos del tejido.
7. La composición de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, o 6 en donde la
composición contiene una o más proteínas extracelulares seleccionadas del

grupo que consiste de proteínas de matriz extracelular tal como fibronectina, proteínas asociadas a células, proteínas derivadas de plasma tal como factor XIII de coagulación sanguínea, proteasas e inhibidores proteasa.

5

8. La composición de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 6, o 7 en donde la composición se reabsorbe y se pone con el tejido durante el proceso de cicatrización.

10

9. La composición de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 en donde la composición comprende adicionalmente un agente que induce coagulación tal como protamina, veneno de serpiente, transglutaminasas, FXIIa, o un sistema amortiguante alcalino fisiológicamente aceptable.

15

10. La composición de las reivindicaciones 1 o 2 en donde el compuesto que contiene estroncio está en forma de un microparticulado soluble, granular o en una forma sólida.

20

11. La composición de la reivindicación 10, en donde el compuesto que contiene estroncio se hace al agregar estroncio en un compuesto que contiene calcio para producir un material que comprende calcio y estroncio que contiene sales.

25

12. La composición de la reivindicación 11, en donde dicho compuesto que contiene calcio es un fosfato de calcio.

13. La composición de la reivindicación 12 en donde el fosfato de calcio se selecciona del grupo que consiste de trifosfato de calcio, alfa-trifosfato de

calcio, fosfato beta tricalcio, polimorfos de fosfato de calcio, hidroxiapatita, carbonato de calcio, sulfato de calcio y sus combinaciones.

- 5 14. La composición de la reivindicación 11, en donde los compuestos que contienen calcio o que contienen estroncio tienen una dimensión de partícula que varía de 100 nanómetros a 50 milímetros.
- 10 15. La composición de la reivindicación 11, en donde los compuestos que contienen calcio o que contienen estroncio tienen una dimensión de partícula de 0.5 a 5 milímetros.
- 15 16. La composición de la reivindicación 11, en donde el porcentaje de sal de estroncio a sales de calcio en dicha composición varía de 0.25% a 100% de sales que contienen estroncio.
17. La composición de la reivindicación 10, en donde el compuesto que contiene estroncio se hace al agregar estroncio en un cristal bioactivo para producir un material de cristal bioactivo que contiene estroncio.
- 20 18. La composición de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 8, 10 11 o 17 en donde el compuesto que contiene estroncio se selecciona del grupo que consiste de cloruro de estroncio, ranelato de estroncio, acetato de estroncio, glutamato de estroncio, aspartato de estroncio, malonato de estroncio, maleato de estroncio, ascorbato de estroncio, treonato de estroncio, lactato de estroncio, fosfato de estroncio, apatitas de estroncio, piruvato de estroncio, alfa-quetoglutarato de estroncio y succinato de estroncio.
- 25 19. La composición de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 17 o 18 que

comprende adicionalmente un coligando estroncio seleccionado del grupo que consiste de grupos calcimiméticos, osteocalcina, aminoácidos tal como L-arginina, y, arginomiméticos y análogos arginina.

- 5 20. La composición de la reivindicación 3 en donde el plastificante es un polietilenglicol, un alcohol polivalente, glicerol, o azúcar seleccionada del grupo que consiste de monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, y sus combinaciones.
- 10 21. La composición de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 que comprende adicionalmente una proteína seleccionada del grupo que consiste de proteínas morfogénicas óseas, hormona paratiroide (PTH), calcitonina, bisfosfonatos, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento similar a insulina y Factores de crecimiento TGF.
- 15
22. La composición de la reivindicación 1 en donde la gelación de la composición ocurre luego de la mezcla de los varios componentes.
- 20 23. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde dicha composición es una composición inyectable.
24. Un método para tratar la enfermedad, lesión o deficiencia ósea en un sujeto vivo, que comprende inyectar en el hueso trabecular de dicho sujeto una
- 25 composición que comprende una composición de la reivindicación 23.
25. El método de la reivindicación 24 en donde inyectar dicha composición dentro del hueso trabecular de dicho sujeto origina una velocidad de

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

- 5 26. Un método para reparar un hueso que tiene un defecto que comprende: (a) fijar mecánicamente el hueso o sus porciones; y (b) rellenar el defecto con una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-23 en una cantidad que origine el efecto de reparación de dicho defecto.
- 10 27. El método de la reivindicación 26, en donde dicho defecto es una fractura ósea y dicha reparación es cicatrización ósea de dicha fractura.
- 15 28. El método de la reivindicación 27, en donde la aplicación de dicha composición origina una velocidad de cicatrización que es más rápida que la observada en la ausencia de la aplicación de dicha composición.
- 20 29. El método de la reivindicación 27, en donde la aplicación de dicha composición origina una velocidad de cicatrización que es más rápida que la observada con la aplicación de una composición similar que no contiene estroncio.
- 30 30. El método de la reivindicación 25 en donde dicho hueso es un hueso largo seleccionado del grupo que consiste de un fémur, una tibia, un húmero y un radio.
- 25 31. Un método para promover el nuevo crecimiento óseo en el sitio de un defecto óseo que comprende poner en contacto dicho sitio de defecto con una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

32. El método de la reivindicación 31, en donde la velocidad de dicho crecimiento óseo es más rápida en la presencia de estroncio en dicha composición cuando se compara con crecimiento óseo visto en la presencia de una composición similar que no contiene estroncio.

COMPUESTOS DE ESTRONCIO QUE CONTIENEN COMPOSICIONES DE
FIBRINA

Resumen

5

Una composición para uso en cicatrización ósea y regeneración ósea en la forma de un gel hidrogel viscoelástico o formulación líquida que comprende fibrinógeno, trombina y un componente inorgánico que comprende un compuesto que contiene estroncio (Sr) y/o posiblemente otro metal tal como un compuesto que contiene

10

calcio. El compuesto que contiene estroncio se puede disolver en las soluciones trombina o se agrega al coágulo en forma particulada cristalina. Luego de mezclar los componentes, la gelación tiene lugar para formar una matriz. La composición también puede comprender un compuesto que contiene yodo que actúa como un plastificante.

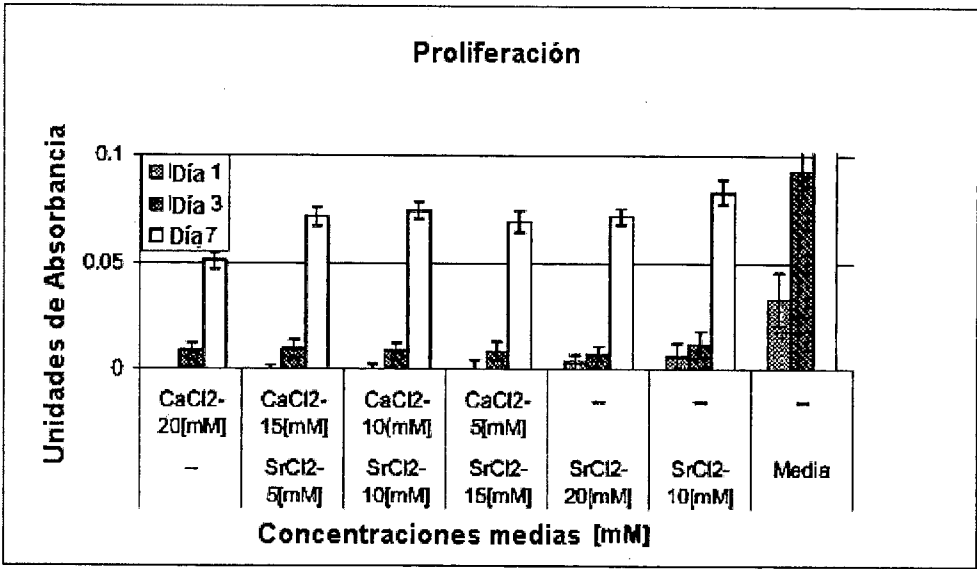


Figura 1

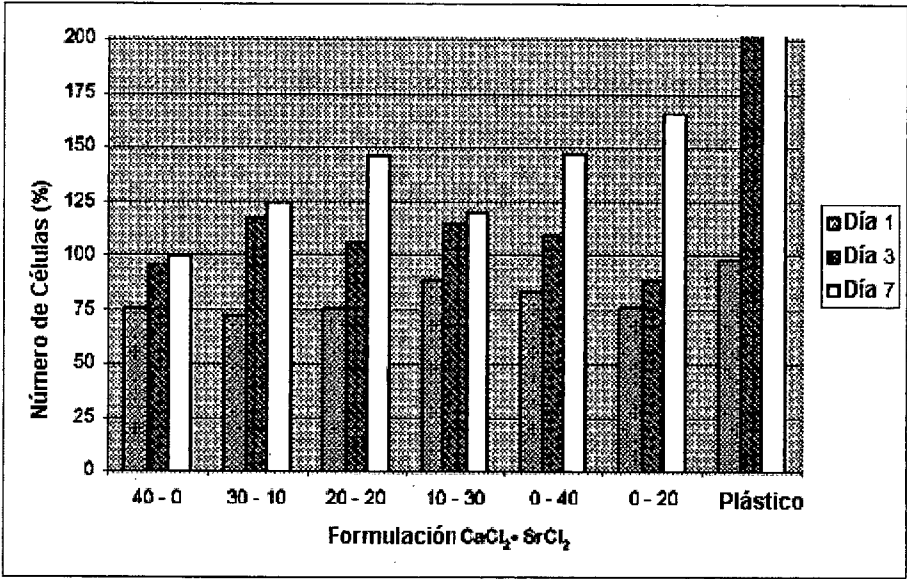


Figura 2

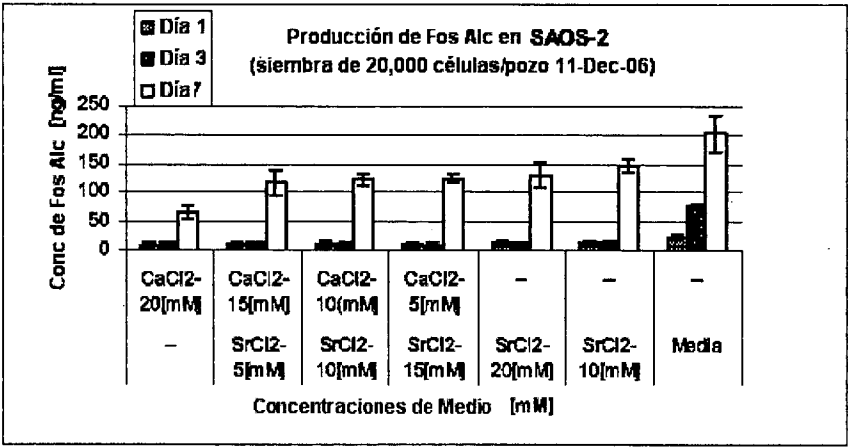


Figura 3.

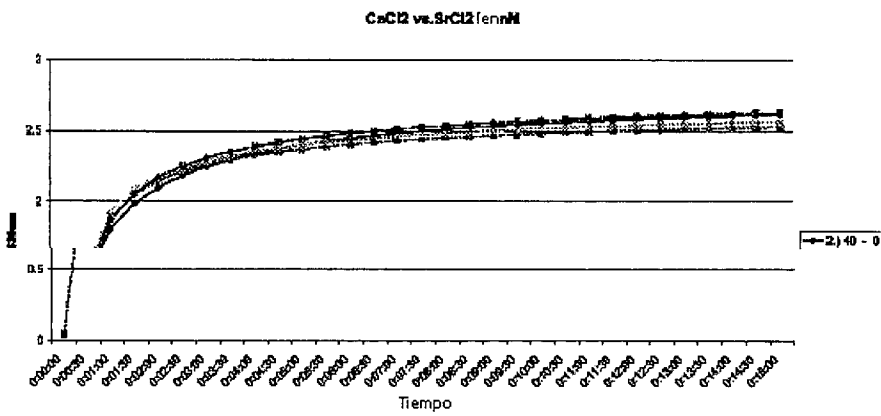


Figura 4.

3/9

5

10

15

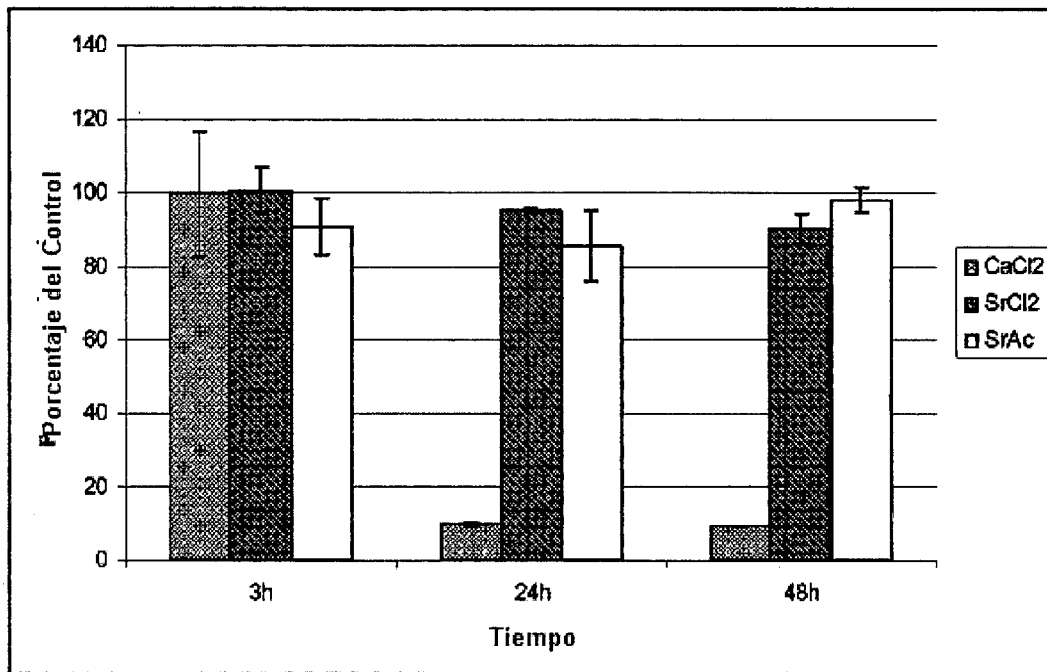


Figura 5.

4/9

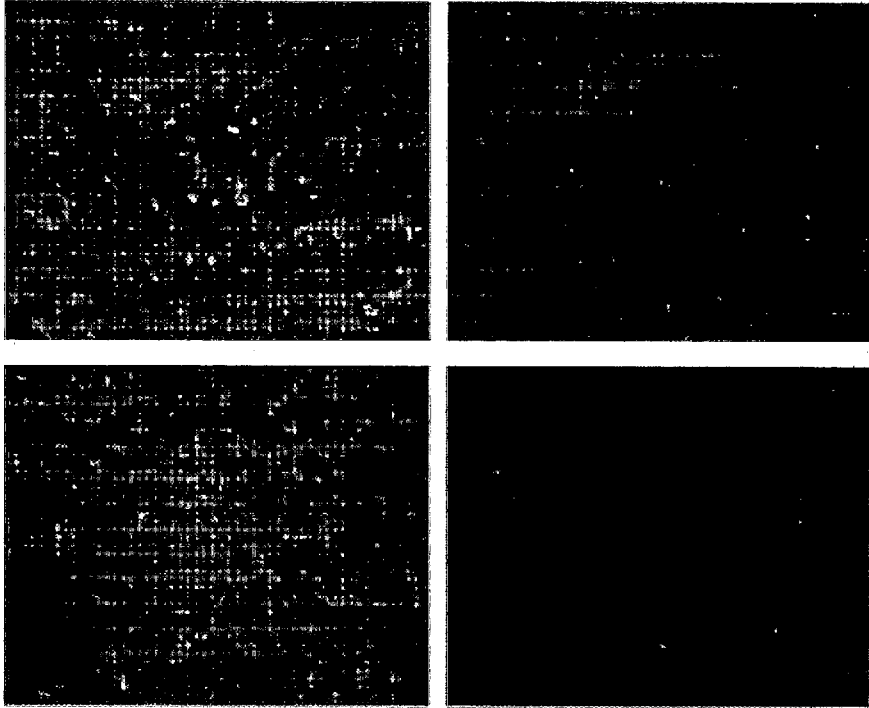
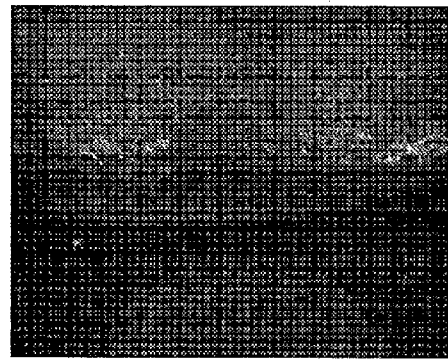
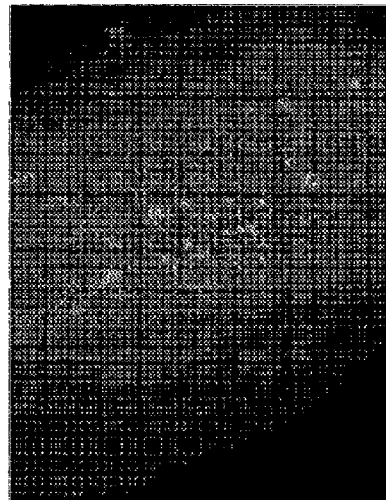


Figura 6

5/9



Superficie superior



Superficie superior

Figura 7

6/9

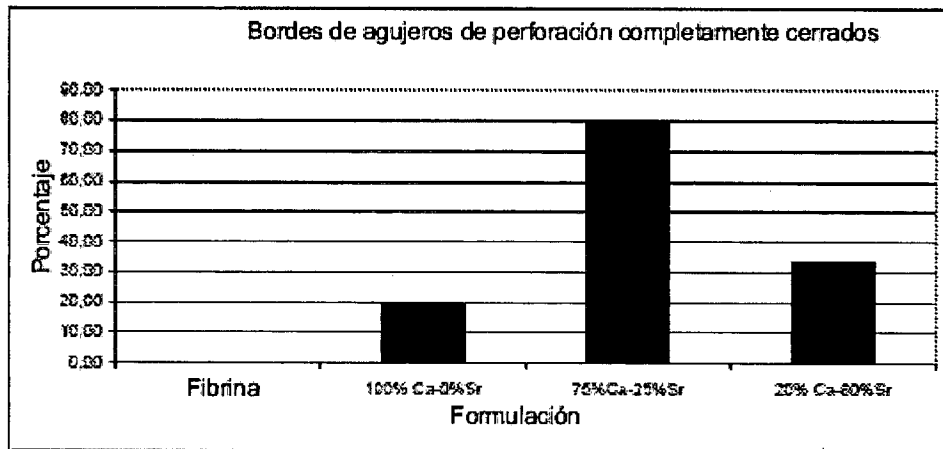


Figura 8:

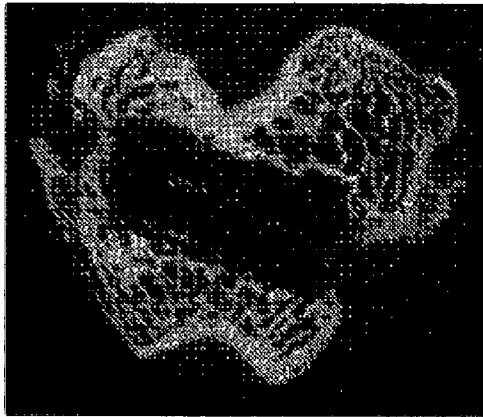


Figura 9

7/9

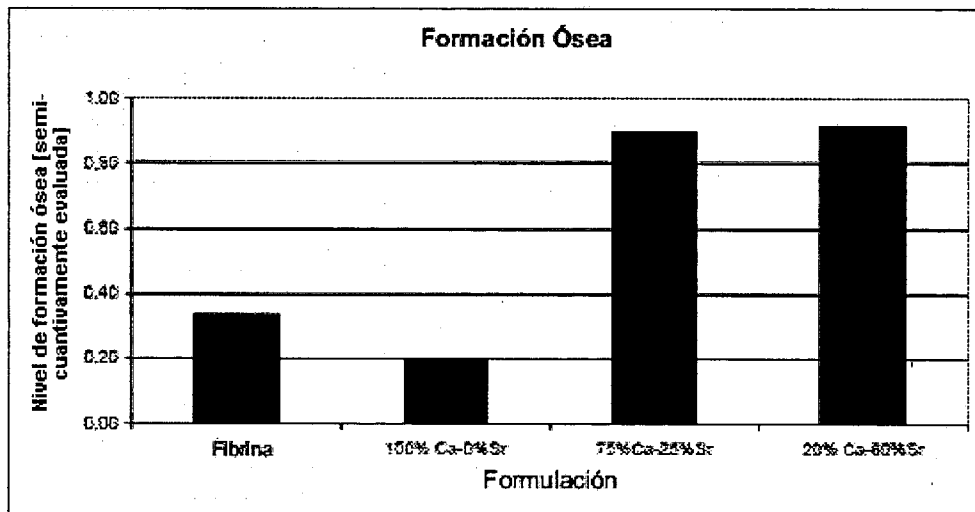


Figura 10

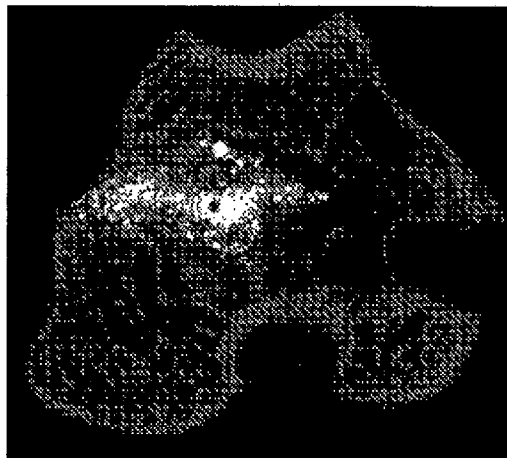


Figura 11

8/9

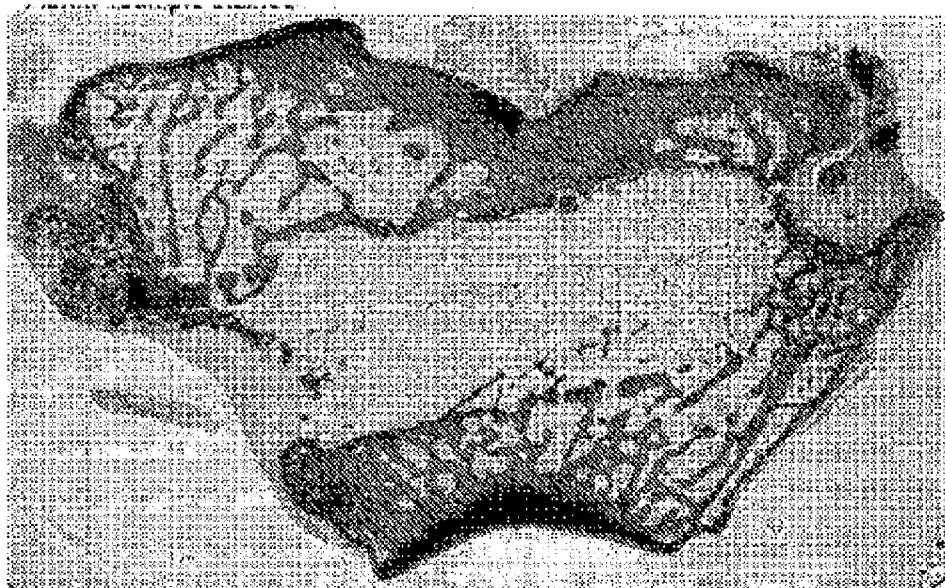


Figura 12



Figura 13

9/9

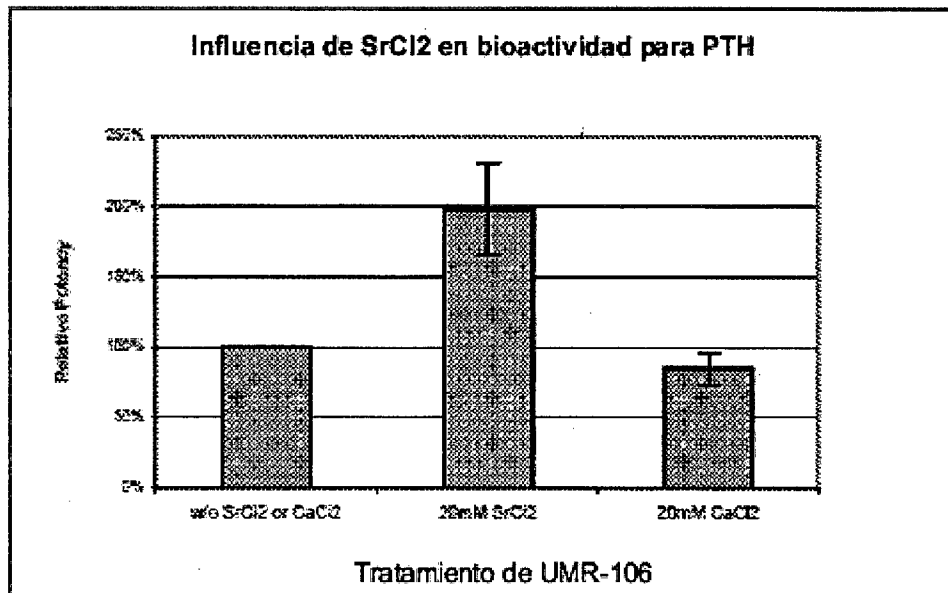


Figura 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/060720

101

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61L24/00 A61L27/22 A61P19/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 618 549 A (PATAT JEAN-LOUIS [FR] ET AL) 8 April 1997 (1997-04-08) column 2, lines 6-27 column 3, lines 40-52 column 4, lines 15-22; claims 1,9,10	1-32
Y	US 2006/216321 A1 (LYU SUPING [US] ET AL) 28 September 2006 (2006-09-28) claims 1,9	1-32
Y	WO 2005/082385 A (OSTEOLOGIX AS [DK]; HANSEN CHRISTIAN [DK]; NILSSON HENRIK [DK]; CHRIST) 9 September 2005 (2005-09-09) the whole document	1-32
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 October 2008		Date of mailing of the international search report 22/10/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Durrenberger, Anne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/060720

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARIE P J ET AL: "AN UNCOUPLING AGENT CONTAINING STRONTIUM PREVENTS BONE LOSS BY DEPRESSING BONE RESORPTION AND MAINTAINING BONE FORMATION IN ESTROGEN-DEFICIENT RATS" JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 5, 1 May 1993 (1993-05-01), pages 607-615, XP000646111 ISSN: 0884-0431 page 614, last paragraph	1-32
A	US 5 856 356 A (TSOUDEROS YANNIS [FR] ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05)	
A	EP 1 741 436 A (SANTOSOLVE AS [NO]; COCKBAIN JULIAN [GB]) 10 January 2007 (2007-01-10)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/060720

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5618549	A	08-04-1997	AT 204174 T	15-09-2001
			AU 675137 B2	23-01-1997
			AU 6788694 A	12-12-1994
			CA 2139865 A1	24-11-1994
			DE 69427947 D1	20-09-2001
			DE 69427947 T2	11-04-2002
			DK 649309 T3	12-11-2001
			EP 0649309 A1	26-04-1995
			ES 2163442 T3	01-02-2002
			FR 2705235 A1	25-11-1994
			WO 9426283 A1	24-11-1994
			JP 3021049 B2	15-03-2000
			JP 8503230 T	09-04-1996
			PT 649309 T	30-01-2002
US 2006216321	A1	28-09-2006	NONE	
WO 2005082385	A	09-09-2005	AU 2005216596 A1	09-09-2005
			CA 2557324 A1	09-09-2005
			EP 1732575 A1	20-12-2006
			JP 2007523916 T	23-08-2007
			KR 20060125861 A	06-12-2006
			US 2008167513 A1	10-07-2008
US 5856356	A	05-01-1999	AT 233558 T	15-03-2003
			AU 711950 B2	28-10-1999
			AU 2490297 A	08-01-1998
			BR 9703603 A	01-09-1998
			CA 2206837 A1	17-12-1997
			CN 1179944 A	29-04-1998
			DE 69719408 D1	10-04-2003
			DE 69719408 T2	24-12-2003
			DK 813869 T3	02-06-2003
			EP 0813869 A1	29-12-1997
			ES 2193337 T3	01-11-2003
			FR 2749759 A1	19-12-1997
			HU 9701059 A2	02-03-1998
			JP 3935557 B2	27-06-2007
			JP 10059852 A	03-03-1998
			NO 972764 A	18-12-1997
			NZ 328106 A	27-04-2001
			ZA 9705323 A	14-01-1998
EP 1741436	A	10-01-2007	NONE	

104

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/060720

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
MCMILLIAN, Nabeela, R. Howrey LLP c/o Docketing Department 2941 Fairview Park Drive, Suite 200 Falls Church, VA 22042-9922 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 19 January 2009 (19.01.2009)	
Applicant's or agent's file reference 00701.0031.00PC00	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/060720	International filing date (day/month/year) 18 April 2008 (18.04.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address BARRY, John, J. Wagramer Strasse 190 A-1220 Vienna Austria	State of Nationality IE	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address BARRY, John, J. Alxingergasse 31/3 A-1100 Vienna Austria	State of Nationality IE	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned	
☐ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Valente Gabriela e-mail pt03.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 03
Facsimile No. +41 22 338 87 20	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 72,593
FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-119370- -00000-0000

Fecha: 2009-10-23 16:55:20 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 108

***** CONSIGNACION *****

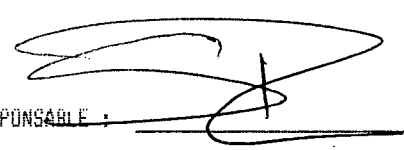
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	106430870	28/09/2009	37,061,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL A#OS 9 a 12 CUATRENTIO	420,000.00

TOTAL : \$ 420,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

107

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900124089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 72,646

FECHA : SEPTIEMBRE 28 DE 2009



No. 09-119370- -00000-0000

Fecha: 2009-10-23 16:55:20 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 108

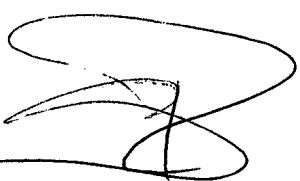
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	106430870	28/09/2009	37,061,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5,000.00
		TOTAL :	\$ 5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

COLO: 13436- 841-029-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 78,660

FECHA : OCTUBRE 19 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-119370- -00000-0000

Fecha: 2009-10-23 16:55:20 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 108

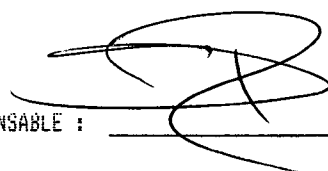
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130928162	19/10/2009	47,325,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

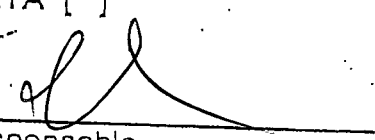
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha **SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

No. 09-119370-00000-0000
Fecha: 2009-10-23 16:55:20 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 108

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



Bogotá,
2020

MO

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

REFERENCIA	Radicación No.	9 119370
	Solicitud internacional	PCT/US2008/060720
	Fecha inicio fase nacional	23/11/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	248

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

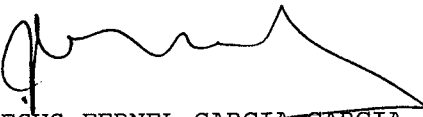
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.: 9 119370


~~JESUS FERNEL GARCIA GARCIA~~

Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 48 ENE. 2010
adpall