

2018

A study of the rheological properties and injectability of calcium phosphate cements

Application to minimally invasive surgical procedures and scaffold fabrication for tissue engineering through rapid prototyping

Yassine Maazouz

Supervisors:

Prof. Maria-Pau Ginebra

Dr. Edgar Bejamín Montufar Jiménez

PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIENCIA I ENGINYERIA
DELS MATERIALS

Tesis per compendi de articles



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA
BARCELONATECH



BIOMATERIALS,
BIOMECHANICS &
TISSUE ENGINEERING

1 Table of Contents

Acknowledgements.....	3
2 Summary	9
3 Objectives and innovation	12
4 State of the art	13
4.1 Bone: a hierarchically organized tissue.....	13
4.1.1 Bone morphology.....	13
4.1.2 Bone architecture	15
4.1.3 Bone Structure	16
4.1.4 Bone cells	19
4.1.5 Bone remodeling.....	20
4.2 Bone diseases and defects.....	22
4.2.1 Osteoporosis	22
4.2.2 Tumors and tumor-like lesions	23
4.2.3 Nonunion fractures.....	24
4.3 Calcium phosphate cements for minimally invasive surgery and 3D printing applications.....	25
4.3.1 Injectability of calcium phosphate cements	26
4.3.2 Robocasting.....	30
Papers	34
Paper I: Relevance of the setting reaction to the injectability of tricalcium phosphate pastes.....	35
Paper II: Self-hardening and thermoresponsive alpha tricalcium phosphate/pluronic pastes.....	48
Paper III: Robocasting of biomimetic hydroxyapatite scaffolds using self-setting inks	62
6 Discussion.....	72
6.1.1 Mechanisms controlling the injectability of α -TCP pastes.....	73
6.1.2 Improvement of clinical performance of α -TCP based cements	73
6.1.3 Relevance of the injectability for 3D printing applications.....	74
7 Conclusions	75

8	Future perspectives	76
9	References	77
9.	Annex. Patente de invención: Cemento inorgánico, inyectable y termosensible para reconstrucción ósea: preparación y uso.....	86
10.	Publications not included in the present thesis.....	104

Acknowledgements

Firstly, I would like to express my sincere gratitude to my Supervisor Prof. Maria Pau Ginebra for the continuous support of my Ph.D. studies and related research, for your patience, motivation, and immense knowledge. Your guidance helped me in all the time of research and writing of this thesis. I could not have imagined having a better mentor for my Ph.D. study.

I would also like to deeply and kindly thank my Supervisor Prof. Edgar Benjamin Montufar for having closely followed my path teaching me and guiding me throughout the research and ordeals I had to face. You have been a true partner during the time of my PhD.

There has been quite a few people that have crossed my path during the years I dedicated to the present work. I can say it was a privilege and an honor to share these moments with you. I could never do this without your support. I would like to express my gratefulness by saying thank you,

To my family, mother, father and sister who have led my path and supported my dreams no matter what.

To Armelle, my partner, who has lived every moments at my side, quenching my doubts and cheering my achievements. I love you.

To my friends, Erik, Quentin, Roberta, Romain, Mireia, Erika, Román, Miquel, José María, Natalia, Virginia, Maria Isabel, Daniela, Xavier Nadal, Manuel Ciurana, Joan Blancafort, Guillaume, Omar, Laurent, Victor , Sara for having shared these moments with me and surrounded me with happiness.

To my colleagues, Gemma, Montse, Cristina, Carles, Noelia, Meritxell, Monica, Jordi, Pablo, Marta, Lluís, Marc, Miquel, Zhitong, Anna, Joanna, Pryia, Sara, Trifón, Montse for having nurtured my learning and helped me so much.

To my master students, Céline, Julien, Santiago, Borja, Juan and Santiago, for having made me question how to communicate my knowledge and for having participated to the knowledge fruitful harvest of the present work.

To Conrado, who is partially responsible of my enrollment in this PhD program.

To my partners at Mimetis Biomaterials for having made possible to build this wonderful company that translates our research into innovative products.

To the employees of Mimetis, Andrea, Amarilys, Victor, Christian, Ana, Claudia and Santiago for supporting me every day at work.



Curs acadèmic:

Acta de qualificació de tesi doctoral

 Nom i cognoms

 Programa de doctorat

 Unitat estructural responsable del programa

Resolució del Tribunal

Reunit el Tribunal designat a l'efecte, el doctorand / la doctoranda exposa el tema de la seva tesi doctoral titulada :

Acabada la lectura i després de donar resposta a les qüestions formulades pels membres titulars del tribunal, aquest atorga la qualificació:

 NO APTE

 APROVAT

 NOTABLE

 EXCEL·LENT

(Nom, cognoms i signatura) President/a	(Nom, cognoms i signatura) Secretari/ària	
(Nom, cognoms i signatura) Vocal	(Nom, cognoms i signatura) Vocal	(Nom, cognoms i signatura) Vocal

_____, _____ d'/de _____ de _____

El resultat de l'escrutini dels vots emesos pels membres titulars del tribunal, efectuat per l'Escola de Doctorat, a instància de la Comissió de Doctorat de la UPC, atorga la MENCIO CUM LAUDE:

SÍ

NO

<p>(Nom, cognoms i signatura)</p> <p>President de la Comissió Permanent de l'Escola de Doctorat</p>	<p>(Nom, cognoms i signatura)</p> <p>Secretari de la Comissió Permanent de l'Escola de Doctorat</p>
--	--

Barcelona, _____ d'/de _____ de _____

2 Summary

The present work addresses two different applications enabled by a specific and useful property of calcium phosphate cements (CPCs): injectability. On the one hand minimally invasive procedures involving the use of CPCs are based on the injectability of such biomaterials, and on the other hand extrusion-based additive manufacturing processes such as robocasting rely on this property to correctly manufacture personalized 3D-printed scaffolds for the treatment of large bone defects.

The present thesis is divided in three different sections.

The first one consists in a study of the differences of injectability of aqueous pastes of the two allotropic forms of tricalcium phosphate, namely α - and β -TCP. The reactivity of the powder was shown to play a significant role in the injectability of TCP pastes. Significant differences were observed between the injection behavior of non-hardening β -TCP pastes and that of self-hardening α -TCP pastes. The differences were more marked at low liquid-to-powder ratios, using fine powders and injecting through thin needles. α -TCP was, in general, less injectable than β -TCP and required higher injection loads. Moreover, clogging was identified as a mechanism hindering or even preventing injectability, different and clearly distinguishable from the filter-pressing phenomenon. α -TCP pastes presented transient clogging episodes, which were not observed in β -TCP pastes with equivalent particle size distribution. Different parameters affecting powder reactivity were also shown to affect paste injectability. Thus, whereas powder calcination resulted in an increased injectability due to lower particle reactivity, the addition of setting accelerants, such as hydroxyapatite nanoparticles, tended to reduce the injectability of the TCP pastes, especially if adjoined simultaneously with a Na_2HPO_4 solution. Although, as a general trend, faster-setting pastes were less injectable, some exceptions to this rule were found. For example, whereas in the absence of setting accelerants fine TCP powders were more injectable than the coarse ones, in spite of their shorter setting times, this trend was inverted when setting accelerants were added, and coarse powders were more injectable than the fine ones.

In the second section thermoresponsive pastes are developed through the combination of CPCs with an inverse-thermoresponsive hydrogel. Although calcium phosphate cements (CPCs) are used for bone regeneration in a wide range of clinical applications, various physicochemical phenomena are known to hinder their potential use in minimally invasive surgery or in highly vascularized surgical sites, mainly because of their lack of injectability or their low washout resistance. The

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

proposed strategy allowed to finely tune the cohesive and rheological properties of CPCs to achieve clinical acceptable injectability. It avoided phase separation during implantation and improved cohesion, avoiding washout of the paste. The thermoresponsive CPC developed combined alpha-tricalcium phosphate with an aqueous solution of pluronic F127, which exhibits an inverse thermoresponsive behaviour, with a gelling transformation at around body temperature. These novel CPCs exhibited temperature-dependent properties. The addition of the polymer enhanced the injectability of the paste, even at a low liquid-to-powder ratio, and allowed the rheological properties of the cement to be tuned, with the injection force decreasing with the temperature of the paste. Moreover, the cohesion of the paste was also temperature-dependent and increased as the temperature of the host medium increased due to gelling induced in the paste. The thermoresponsive cement exhibited excellent cohesion and clinically acceptable setting times at 37°C, irrespective of the initial temperature of the paste. The addition of pluronic F127 slightly delayed the setting reaction in the early stages but did not hinder the full transformation to calcium-deficient hydroxyapatite. Moreover, the frozen storage of premixed thermoresponsive cement pastes was explored, the main physicochemical properties of the cements being maintained upon thawing, even after 18 months of frozen storage. This avoids the need to mix the cement in the operating theatre and allows its use off-the-shelf. The reverse thermoresponsive cements studied herein open up new perspectives in the surgical field, where the sequential gelling/hardening of these novel cements could allow for a better and safer clinical application.

Using the knowledge acquired about the injectability behavior of TCP pastes, the additive manufacturing of 3D printed scaffolds is studied in the last section. More precisely, this study dealt with the robocasting of alpha-tricalcium phosphate/gelatine reactive slurries as a bioinspired self-setting ink for the production of biomimetic hydroxyapatite/gelatine scaffolds. A controlled and totally interconnected pore network of approximately 300 μm was obtained after ink printing and setting, with the struts consisting of a micro/nanoporous matrix of needle-shaped calcium deficient hydroxyapatite crystals, with a high specific surface area. Gelatine was effectively retained by chemical crosslinking. The setting reaction of the ink resulted in a significant increase of both the elastic modulus and the compressive strength of the scaffolds, which were within the range of the human trabecular bone. In addition to delaying the onset of the setting reaction, thus providing enough time for printing, gelatine provided the viscoelastic properties to the strands to support their own weight, and additionally enhanced mesenchymal stem cell adhesion and proliferation on the surface of the scaffold. Altogether this

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

new processing approach opens good perspectives for the design of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering with enhanced reactivity and resorption rate.

Altogether, these three studies demonstrate that injectability is a property of paramount importance for the development of safe and efficacious CPCs and propose options to tackle the issues encountered both in minimally invasive procedures and in solid free form fabrication of calcium phosphate scaffolds.

The results obtained are set out in the following published articles, which constitute the core of the present PhD Thesis:

Paper I

E. B. Montufar¹, Y. Maazouz¹ and M. P. Ginebra, "Relevance of the setting reaction to the injectability of tricalcium phosphate pastes.," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 4, pp. 6188–98, Apr. 2013.

¹These authors have contributed equally to this paper.

Paper II

Y. Maazouz, E. B. Montufar, J. Malbert, M. Espanol and M. P. Ginebra, "Self-hardening and thermoresponsive alpha tricalcium phosphate/pluronic pastes," *Acta Biomater.*, vol. 49, pp. 563–574, Feb. 2017.

Paper III

Y. Maazouz, E. B. Montufar, J. Guillem-Marti, I. Fleps, C. Öhman, C. Persson and M. P. Ginebra, "Robocasting of biomimetic hydroxyapatite scaffolds using self-setting inks," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 33, p. 5378, Jun. 2014.

Additional document: Patents

Cemento inorgánico, inyectable y termosensible para reconstrucción ósea: preparación y uso.

3 Objectives and innovation

The aim of the present Philosophy Doctor (PhD) thesis was to increase the knowledge on the mechanisms controlling the injectability of α -TCP based CPCs and to develop new strategies to improve the performance of CPCs in minimally invasive surgery applications as well as for production of personalized 3D-printed scaffolds for bone tissue engineering through robocasting. Specific objectives of the thesis were:

- 1) To study the relevance of the setting reaction of α -TCP pastes on their injection behavior. (Paper I)
- 2) To develop a smart CPC with thermoresponsive properties for minimally invasive surgery. (Paper II)
- 3) To produce biomimetic scaffolds by robocasting that do not require a sintering post-treatment for consolidation and study their properties. (Paper III)

4 State of the art

4.1 Bone: a hierarchically organized tissue

The skeleton serves as a structural support system. It has mechanisms to grow and change in shape and size to suit varying mechanical forces. Moreover, it acts as a store of ions, being involved in the calcium/phosphate balance and in the detoxification of heavy metals. Bone tissue is continuously formed and remodeled throughout life. This is necessary since otherwise it would cross its tolerance limit after the repetitive stress and torsion it faces on a nearly daily basis. Initially, bone achieves its increase in size and shape through growth (increase in size) and subsequent modeling. In late childhood and adulthood there is continuous renewal of the skeleton, by a process termed remodeling. Both modeling and remodeling require two separate processes namely bone resorption and bone formation to occur simultaneously to be effective. This requirement is known as “coupling” or “synchronization”.

4.1.1 Bone morphology

There are five types of bones in the human body, long, flat, short, sesamoid and irregular bones. Flat bones are responsible for the internal organs protection, some examples are the cranial bones, thoracic ribs or the scapulae. Long bones function as the mechanical support and structure to enable movement, most bones situated in upper and lower limbs are long bones such as the femur, tibia and fibula or humerus, radius and ulna. Short bones are mostly situated in joint areas of the upper and lower limbs extremities and function as movement enablers as well as mechanical absorbers. Sesamoid bones are calcified tissues embedded in tendons and provide mechanical strength to tendons, they also act as wear reinforcement elements such as in the case of the patella or kneecap. Finally irregular bones are the most complex in shape and their function vary depending on their anatomic site, for instance vertebrae protect the spinal chord and support the weight of the upper body while the pelvic bones protect the organs contained within it.

In the case of long bones, different parts can be distinguished, as displayed in Figure 4-1 and described herein after.

Epiphysis: This term refers to the end of a tubular bone, lying between the physeal plate (in developing bone) and the articular cartilage. In adults, the physeal plate is

absent. The portion of the bone that the epiphysis would have occupied in the growing skeleton is arbitrarily referred to by the same name.

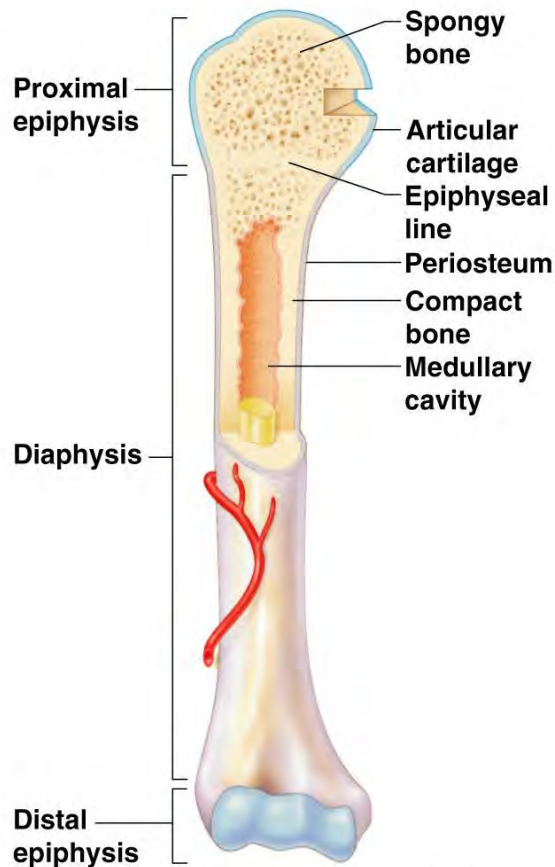
Metaphysis: This refers to the widened portion of bone occupying the area between the cylindrical diaphysis and the physis/epiphysis. Several tumors have an epicenter in the metaphysis.

Diaphysis (shaft): This refers to the middle, cylindrical portion of a tubular bone. There is a thick cortex surrounding a marrow space. The latter contains trabecular bone, hematopoietic elements and fat in varying compositions, the proportions of which change with age.

Bone marrow: The medullary cavity is filled with varying proportions of hematopoietic marrow, fat and trabecular bone. The marrow is most prevalent in younger age groups and in the metaphyseal region of long bones. The diaphysis contains mainly fat in adults. In comparison to the appendicular (limb) skeleton, the axial skeleton has a greater proportion of bone marrow.

Periosteum: The periosteum is composed of an *outer fibrous* layer and an *inner cambium* (cellular) layer. The cambium layer is cellular and contains osteoprogenitor cells and fibroblasts. When tendons insert into bone, the collagen fibers (Sharpey's fibers) pass through the periosteum and then into the bone lamellae

Endosteum: The endosteum is composed of a resting layer of marrow at its interface with bone. This is not a morphologically recognizable layer of tissue at the light or electron microscopic level. It is, however, a convenient concept that explains the functional changes seen in physiologic and pathologic alterations in bone at the bone medullary cavity interface.



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

Figure 4-1- Long bone parts

4.1.2 Bone architecture

Moreover, bone has a complex structure, organised hierarchically at different levels. It presents different architectures at a macroscopic level, namely cortical bone, and cancellous bone

Cortical bone

Cortical bone, which is also compact bone, is dense and has a bony matrix leaving only tiny spaces (lacunae) that contain the osteocytes, or bone cells. Compact bone makes up 80 percent of the human skeleton; the remainder is cancellous bone. Both types are found in most bones. Compact bone forms a shell around cancellous bone and is the primary component of the long bones of the arm and leg and other bones, where its greater strength and rigidity are needed. Mature compact bone is lamellar, or layered, in structure. It is permeated by an elaborate system of

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

interconnecting vascular canals, the haversian systems, which contain the blood supply for the osteocytes; the bone is arranged in concentric layers around these canals, forming structural units called osteons. Immature compact bone does not contain osteons and has a woven structure. It forms around a framework of collagen fibres and is eventually replaced by mature bone in a remodeling process of bone resorption and new bone formation that creates the osteons.

Cancellous bone

Cancellous bone, which is also called trabecular (or spongy) bone, is light and porous and encloses numerous large spaces, which is what gives it the honeycombed appearance discussed previously. The bone matrix, or framework, is organized into a three-dimensional latticework of bony processes, the trabeculae, arranged along lines of stress. The spaces between are often filled with marrow. Cancellous bone makes up about 20 percent of the human skeleton, providing structural support and flexibility without the weight of compact bone. It is found in most areas of bone that are not subject to great mechanical stress. It makes up much of the enlarged ends (epiphyses) of the long bones and is the major component of the ribs, the shoulder blades, the flat bones of the skull, and a variety of short, flat bones elsewhere in the skeleton. The open structure of cancellous bone enables it to dampen sudden stresses, as in load transmission through the joints. Varying proportions of space to bone are found in different bones according to the need for strength or flexibility.

4.1.3 Bone Structure

At a microscopic level bone can be considered as a composite material with a complicated arrangement of microscale subunits formed from nanoscale crystals embedded in a biopolymer matrix (Figure 4-2 and 3). The basic components are calcium phosphate crystals (65wt.%), collagenous proteins, cells and other macromolecules (lipids, sugars, etc.) (25wt.%), and water (10%)[1].

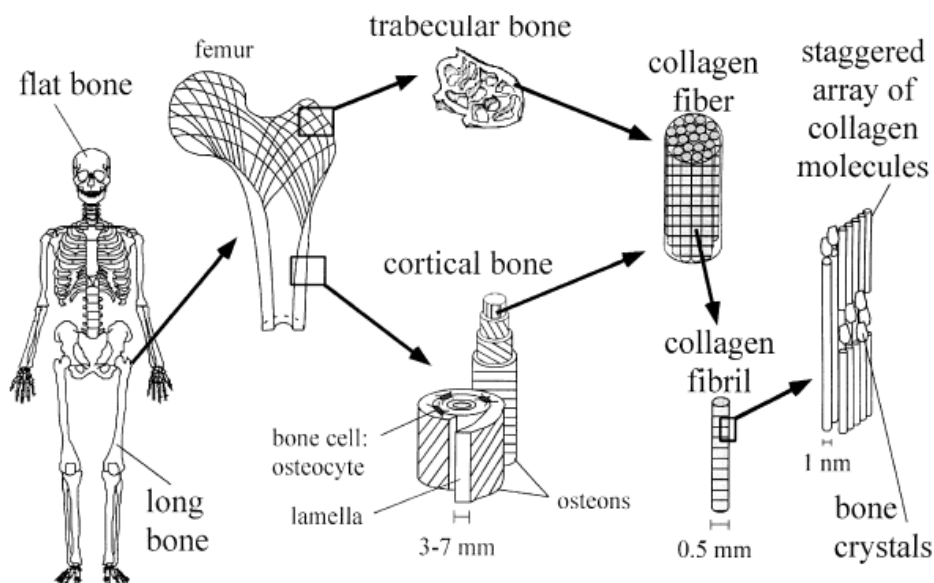


Figure 4-2 – Bone structure from the macroscopic to the nanoscale. Adapted from [1]

The unique properties of bone derive from the combination of the crystal/biopolymer material and the layered arrangement of these subunits. Not surprisingly, the synthesis and maintenance of such a complex living material is quite intricate. Bone formation is accomplished by coordinated multicellular activity. Populations of cells are recruited to a future bony site and are given biochemical signals to produce bone. The mineralization of bone is a cell-mediated process involving the specific, highly ordered deposition of a unique form of calcium phosphate confined to precise locations within the organic matrix. Precise assembly of the highly ordered collagenous matrix having specific mineralization sites, and mineral deposition confined to the matrix sites, are essential for bone to meet its multifunctional property requirements.

Bone mineralization is thought to commence heterogeneously within the supersaturated hole zones in the collagen fiber bundles. However, the small size of the hole zones precludes actual testing of the microchemistry and protein content within them. A schematic of what is believed to occur chemically within a hole zone at the moment of mineralization was described by Glimcher *et al.* [2]. Ions of calcium and phosphate are shown loose and bound to localized matrix proteins arranged with a molecular periodicity that may serve to nucleate the mineral phase heterogeneously. It is known that initiation of mineralization requires a combination of events, including increases in the local concentration of precipitating ions, formation or exposure of mineral nucleators, and removal or modification of mineralization inhibitors.

Injectability of calcium phosphate cements:
Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

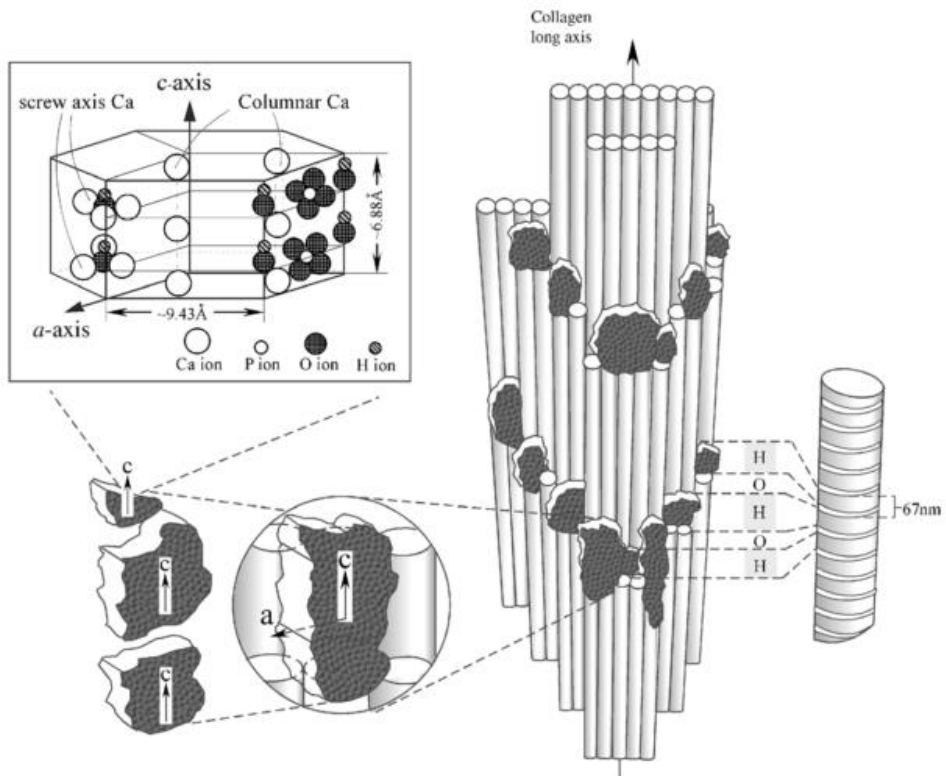


Figure 4-3 – Organization and crystalline orientation of apatitic crystals around collagen fibers in human bone tissues. Adapted from [3]

Bone formation involves the coordination of a variety of cellular activities in specific locations. Multifunctional property requirements are met by a tailored formation process and variation of material architecture among bones and even within a single bone. Skeletal cells build a mineralized tissue through the use of an organic scaffold and maintain it through remodeling during the lifetime of the organism. The cell activities and the mineralization of the organic matrix are governed by organic macromolecules found both locally and systemically. The mineralization is confined to specific locations within the collagen matrix and the mineral formed has a unique chemical composition and physical structure. The fact that a simple mixture of collagen fibrils with precipitated apatite prepared in vitro does not produce a substance with mechanical properties even close to that of bone, demonstrates that the hierarchical arrangement and precise cell-mediated construction of bone is of the utmost importance.

Injectability of calcium phosphate cements:
Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

4.1.4 Bone cells

The major functions of bone cells include matrix formation (osteogenesis), mineralization, and degradation (resorption). Formation and resorption can and generally do occur simultaneously. During the first two decades of life when the skeleton is growing, bone formation exceeds its degradation. With aging, the rate of bone formation declines to a slightly greater extent than the rate of resorption, resulting in a progressive bone loss as bone remodeling continues.

Osteoprogenitor Cells

These are undifferentiated mesenchymal cells, and have the properties of stem cells, that is, the potential for proliferation and a capacity to differentiate. These cells have the potential to differentiate into osteoblasts, chondroblasts, bone marrow stromal cells, or fibroblasts depending on the nature of the stimulus, and the local microenvironment. They are present in the inner layer of the periosteum and the endosteum lining marrow cavities, osteonal (Haversian) canals and the perforating (Volkmann's) canals. Osteoprogenitor cells persist throughout postnatal life as bone-lining cells; they are reactivated in adults during the repair of bone fractures and other injuries.

Osteoblasts

The cells responsible for the synthesis and mineralization of bone during both initial bone formation and later bone remodeling are called osteoblasts. Osteoblasts form a closely packed sheet on the surface of the bone, from which cellular processes extend through the developing bone. They arise from the differentiation of osteogenic cells in the periosteum, the tissue that covers the outer surface of the bone, and in the endosteum of the marrow cavity. This cell differentiation requires a regular supply of blood, without which cartilage-forming chondroblasts, rather than osteoblasts, are formed. The osteoblasts produce many cell products, including the enzymes alkaline phosphatase and collagenase, growth factors, hormones and collagen, the main constituent of the organic component of bone. Eventually the osteoblast is surrounded by the growing bone matrix, and, as the material calcifies, the cell is trapped in a space called a lacuna. Thus entrapped, it becomes an osteocyte, or bone cell.

Osteocytes

The cells that lie within the substance of fully formed bone are known as osteocytes. Each cell occupies a small chamber called a lacuna, which is contained in the

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

calcified matrix of bone. Osteocytes derive from osteoblasts, or bone-forming cells, and are essentially osteoblasts surrounded by the products they secreted. Osteocytes communicate with each other as well as with free bone surfaces via extensive cytoplasmic processes that occupy long, meandering channels (canaliculi) through the bone matrix. Cytoplasmic processes of the osteocyte extend away from the cell toward other osteocytes through canaliculi. Moreover, through these canaliculi, nutrients and waste products are exchanged to maintain the viability of the osteocyte. The osteocyte is involved in bone remodeling by transmitting signals to other osteocytes in response to even slight deformations of bone caused by muscular activity. In this way, bone becomes stronger if additional stress is placed on it (for example, by frequent exercise or physical exertion) and weaker if it is relieved of stress (for example, by inactivity). The osteocyte may aid in calcium removal from bone when the body's calcium level drops too low.

Osteoclasts

Osteoclasts are large multinucleated cells responsible for the dissolution and absorption of bone (figure 3-4). Bone is a dynamic tissue that is continuously being broken down and restructured in response to such influences as structural stress and the body's requirement for calcium. The osteoclasts are the mediators of the continuous destruction of bone. Osteoclasts occupy small depressions on the bone's surface, called Howship lacunae. The lacunae are thought to be caused by erosion of the bone by the osteoclasts' enzymes. Osteoclasts are formed by the fusion of many cells derived from circulating monocytes in the blood. These, in turn, are derived from the bone marrow. Osteoclasts may have as many as 200 nuclei, although most have only 5 to 20. The side of the cell closest to the bone contains many small projections (microvilli) that extend into the bone's surface, forming a ruffled, or brush, border that is the cell's active region. Osteoclasts produce a number of enzymes, chief among them acid phosphatase, that dissolve both the organic collagen and the inorganic calcium and phosphorus of the bone. Mineralized bone is first broken into fragments; the osteoclast then engulfs the fragments and digests them within cytoplasmic vacuoles. Calcium and phosphorus liberated by the breakdown of the mineralized bone are released into the bloodstream. Unmineralized bone (osteoid) is protected against osteoclastic resorption.

4.1.5 Bone remodeling

The remodeling of bone is a continuous process of synthesis and destruction that gives bone its mature structure and maintains normal calcium levels in the body (figure 4-4). Destruction, or resorption, of bone by osteoclasts releases calcium into the bloodstream to meet the body's metabolic needs and simultaneously allows the

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

bone to alter in size and shape as it grows to adult proportions. Osteoclasts act on the inner surfaces of bones, in the marrow cavity and the spaces of cancellous bone, to widen these cavities. They also act on the outer surfaces to reduce bony processes, such as the epiphyseal swellings at the ends of the long bones of the arm and leg. Osteoclast activity takes place behind the epiphyseal growth zone to reduce former swellings to the width of the lengthening shaft. Within the bone, osteoclastic destruction helps to convert immature bone (called woven bone) into mature compact bone by clearing long tubular spaces that will serve as centres for the development of osteons. While the osteoclasts resorb bone at various sites, osteoblasts make new bone to maintain the skeletal structure. During childhood, bone formation outpaces destruction as growth proceeds. After skeletal maturity is reached, the two processes maintain an approximate balance.

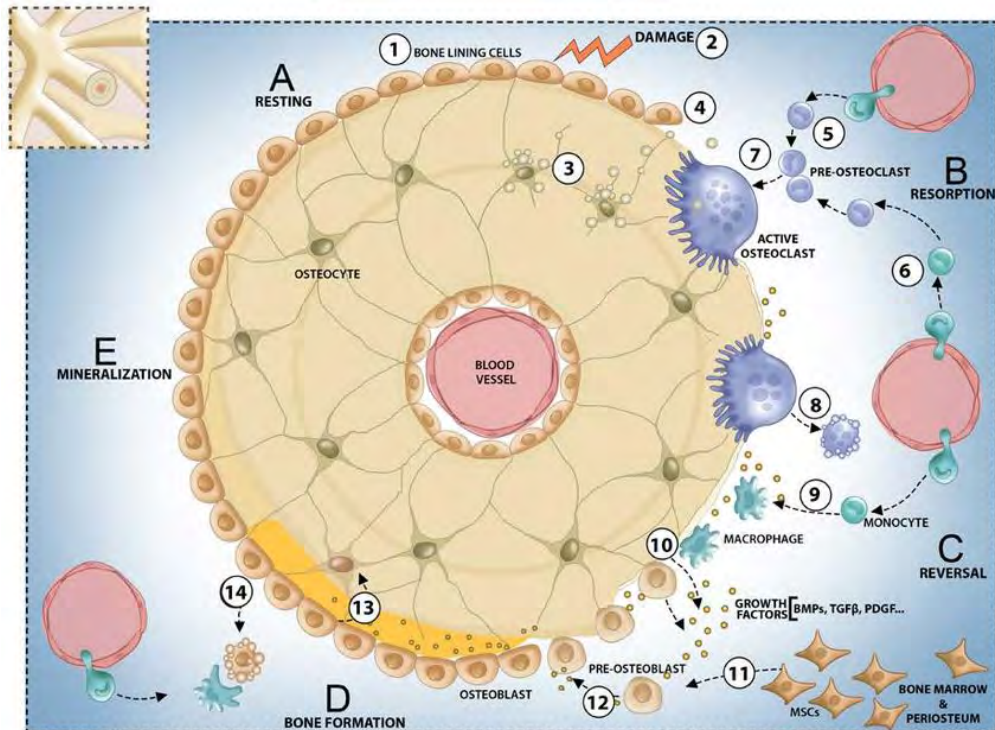


Figure 4-4 - Bone remodeling cycle adapted from [4]

The mechanism of bone resorption involves protons (hydrogen ions) secreted by an ATP driven proton pump in the ruffled border of osteoclasts. The enzyme carbonic anhydrase II is essential in the generation of hydrogen ions. Simultaneously, acid hydrolases are released from lysosomes. Osteoclasts can move over the bone surface, creating many such resorptive pits. These pits are well visualized by scanning electron microscopy, and correspond to the Howships' lacunae in routine sections. A combination of the acid created by the hydrogen ions, and the

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

proteolytic enzymes, provides optimal conditions for the resorption of bone and degradation of collagen. Osteoclasts have calcitonin (but not PTH or vitamin D) receptors. They are stimulated by IL-6 (in combination with IL-1, IL-3 and IL-11) and RANK-ligand[5]. These cytokines are produced locally by cells of the osteoblast lineage under the influence of PTH, vitamin D, TGF- β , IL-1 and TNF. The regulation of osteoclast differentiation is a subject of intense ongoing study with implications for the treatment of a variety of diseases ranging from osteoporosis to skeletal dysplasias such as osteopetrosis. It involves numerous cytokines including macrophages colony-stimulating factor (M-CSF), RANK-ligand (present on osteoblasts)[6], RANK receptor (present on osteoclast precursors) and osteoprotegerin (OPG), a decoy protein.

4.2 Bone diseases and defects

In general osseous injuries are postulated to preclude spontaneous healing [7].The non-regenerative threshold of bone was determined in a variety of research animal models inducing so-called critical-sized defects. Critical-sized defects can be defined as "the smallest size intraosseous wound in a particular bone and species of animal that will not heal spontaneously during the lifetime of the animal" [8] or as a defect which shows less than 10% bony regeneration during the lifetime of an animal. Although the minimum size that defines a defect as "critical" is not well understood, it has been described as a segmental bone deficiency exceeding 2-2.5 times the diameter of the affected bone [9]. However, a critical defect in long bones may also depend on the species' phylogenetic scale, anatomic defect location, associated soft tissue, and biomechanical conditions in the affected limb as well as age, metabolic and systemic conditions, and related co-morbidities. In this section some of the medical conditions that either increase the risk of fracture or require a tissue resection are described. These pathologies may lead eventually to to critical sized bone defects requiring appropriately designed bone grafts to boost bone regeneration.

4.2.1 Osteoporosis

Osteoporosis is a metabolic bone disorder characterized by decreased bone mass, enhanced bone fragility, and increased susceptibility to bone fractures[10][11]. It is a major health problem affecting more than 25 million individuals in the United States and is responsible for well over one million bone fractures each year[10], [12], [13]. The annual financial costs of osteoporosis in the U.S. alone – based on hospitalization costs and acute and long-term care – are estimated to exceed ten billion dollars. And with the rapid aging of the population, these costs are expected

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

to increase dramatically. The bone loss that precedes the osteoporotic fracture is a symptomless process, so osteoporosis may go undetected until bones become so brittle that even the slightest trauma causes a fracture[10]. The spine is the most common region of fracture, with one third of women 65 years and older having sustained spinal vertebrae fractures, leading to loss of height, kyphosis (“dowager’s hump”), and chronic back pain [10], [13], [14]. By extreme old age, one of every three women and one of every six men will have had a hip fracture which, by any measure, is the most devastating of all osteoporotic fractures[13], [15].

A high number of these fractures require the use of bone grafts in order to heal correctly[16], [17].

4.2.2 Tumors and tumor-like lesions

Malignant bone tumors are rare [18]. Nonetheless benign lesions like cysts or benign tumors are a lot more frequent (figure 4-5), and even though they result in being less harmful, they can provoke acute or chronic pains, weakening of the bone structure resulting in fracture or neurological disorder condition if affecting the spine[18].

In many cases the clinicians opt for resection surgery, which implies the lesion’s removal leaving a bone defect with complex shapes and sizes. Either, to reduce the patient’s healing period or when the defect’s size ranges above the critical-size, it is usually filled with a bone graft extracted from the patient’s iliac crest complicating tremendously the surgery condition in terms of time, cost and sterility without mentioning the chronic pain experienced by 20% of the patients[19].



Figure 4-5 Benign Lipoma – adapted from [20]

Injectability of calcium phosphate cements:
Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

4.2.3 Nonunion fractures

A fracture is a break in the continuity of a bone together with a disruption of the blood supply to the bone. The healing process begins as soon as the bone is broken, provided that the fundamental principles of fracture treatment (reduction and immobilization) are respected. Fracture repair must be considered a regenerative process rather than a healing process, because the injured part is replaced by the formation of new bone tissue (callus) instead of scar tissue. The callus formed outside the bone is termed external callus while the callus in the medullary cavity is termed internal callus. If a fracture is not displaced and is stable, only a cast or a brace may be necessary to maintain immobilization (with a small amount of interfragmentary motion). In this case bone callus forms “under natural conditions”. For unstable or displaced fractures operative treatment with an internal or external fixation is required. Operative treatment modifies the process of fracture repair: in this case a different kind of process (callus formation “after operative treatment”) is observed. When the fracture is caused by a high energy impact the bone might be fragmented in several small parts causing an important bone loss. In this case, a simple fixation is not sufficient to achieve bone regeneration, since the size of the defect is above the critical size and often results in pseudo-arthritis or nonunion. Thus it is compulsory to provide the bone with a scaffold which can guide and be replaced by newly formed bone[21]. The overall risk of nonunion in fractures is estimated to be as high as approximately 2%[22], and this risk can increase to up to 9% for certain types of fractures and patient age range. The cost per case to treat such nonunion fractures ranges from 8000€ to 91000€ approximately [23] and constitutes a heavy burden on the healthcare systems.

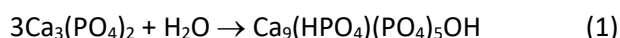
4.3 Calcium phosphate cements for minimally invasive surgery and 3D printing applications

CPCs are blends of one or more calcium phosphates (CaP) with a liquid that undergo a dissolution-precipitation process which convert them into a solid body. Since CPCs are biocompatible, bioconductive and support bone remodeling *in vivo* [24], their application as materials for bone regeneration have increased in fields such as orthopedic surgery, dentistry and maxillofacial surgery. The diversity of reactants [25] and other parameters, such as liquid to powder ratio or particle size distribution [26], [27] provide with a range of CPCs formulations to obtain tailor-made cements, which in turn justifies wide research interest in these biomaterials. Amongst CPCs, calcium deficient hydroxyapatite (CDHA) cements are of paramount interest since simultaneous dissolution of the solid reactant(s) is followed by the precipitation of micro/nanostructured hydroxyapatite with similar crystallinity and composition to those of the minerals that form bones [27].

Two relevant features of the set CPCs are their micro/nanostructure and the intrinsic porosity [26]. While the high porosity is detrimental to the mechanical properties and constitutes a drawback for load bearing applications, it is a remarkable asset regarding the interaction with biological systems and for drug delivering [28]. However, CPCs per se do not possess macropores intrinsically, fact that precludes bone cells from colonizing the material in its bulk. Thus macroporosity has to be introduced through different strategies [29]–[33] in order to permit cell diffusion which is of paramount interest in bone regeneration.

In addition to moldable CPC pastes, the elaboration of pre-set CPC implantable blocks or granules is still relevant—even when injecting them is not a technical issue anymore—as the hardening process is completed at physiological temperature. This way, the setting reaction of CPCs not only allows obtaining microstructures that enhance osteoconduction related phenomena [34] but could also be regarded as a major asset from a drug delivery perspective since most drugs are organic compounds or proteins that can suffer from heat degradation or denaturation, respectively, during the high temperature sintering of conventional CaP ceramics.

Alpha tricalcium phosphate (α -TCP) is one of the most extended reactants used in CPCs. In spite of its sparing solubility in water ($-\log K_s = 25.5$; at 25 °C), α -TCP in form of a powder is able to hydrolyze progressively producing calcium deficient hydroxyapatite (CDHA; Ca/P ratio = 1.5) according to the following chemical reaction (1). This conversion produces an entangled network of CDHA crystals (Figure 4-6) that is responsible for the development of the mechanical properties of the cement.



Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

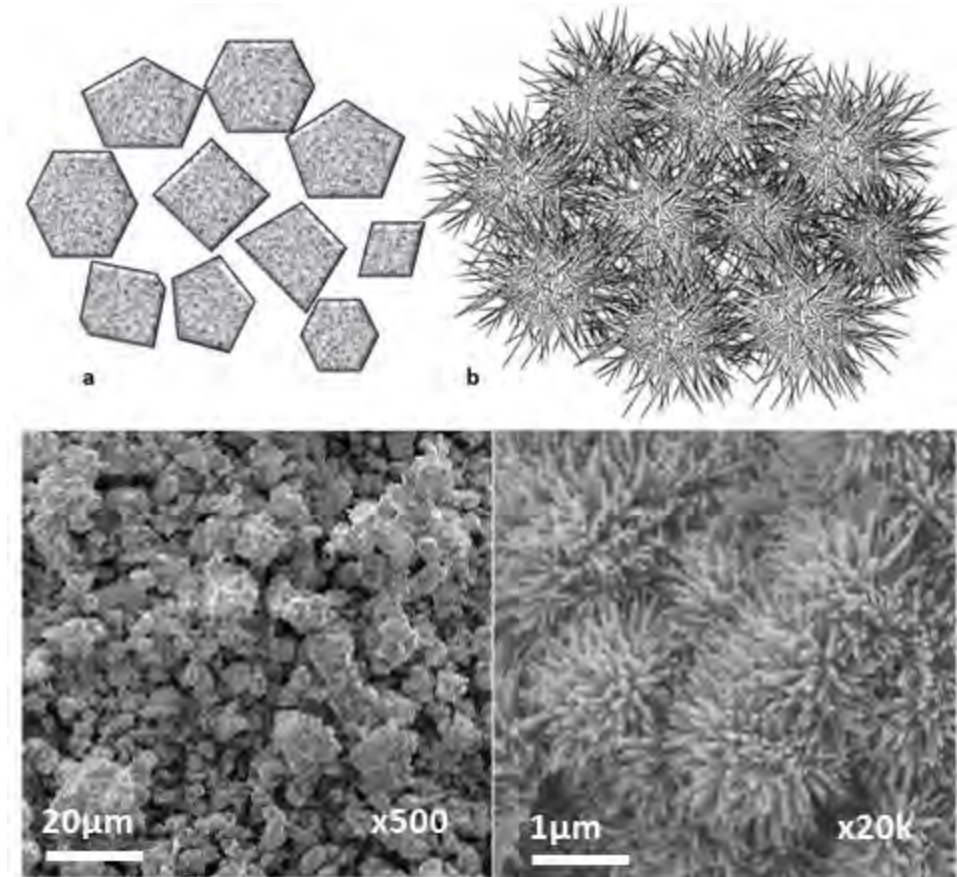


Figure 4-6 Schematic and SEM micrographs of a) Loose particles of α -TCP before setting; b) Entangled network of nanosized calcium deficient hydroxyapatite after setting 7days in water at 37°C.

4.3.1 Injectability of calcium phosphate cements

Nowadays improving the extrusion of CaP slurries can be considered as relevant for the development of fully injectable CPCs for minimal invasive bone grafting procedures. In fact, the ideal cement should be sufficiently handleable during injection and should subsequently harden quickly. In spite of many contributions to the field across the last decade [35], [36], controlling the injectability of CPCs remains a key issue to achieve. The complexity to comprehend injectability comes from the fact that CPCs pastes are biphasic fluids with high solid content and broad particle size distributions, which make them non Newtonian fluids with intricate rheological behavior depending on time, setting reaction and shear rate [37]–[40] as will be detailed herein below. In order to simplify the study of the injectability, some authors have identified the most important parameters that control the injectability of non-self-setting CaP pastes instead of self-setting CaP pastes (cements) [41], [42]. These works proposed beta tricalcium phosphate (β -TCP) as a non-self-setting

Injectability of calcium phosphate cements:
Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

model due to its lower solubility in water ($-\log K_s = 28.9$; at 25 °C) compared to α -TCP, which prevents it from setting. Among all paste parameters investigated for their effect on injectability the most influencing were the liquid to powder (L/P) ratio, particle size distribution, particle morphology, plastic limit (PL), viscosity of the liquid phase and the incorporation of additives that either decreased the cement PL or improved particle lubrication.

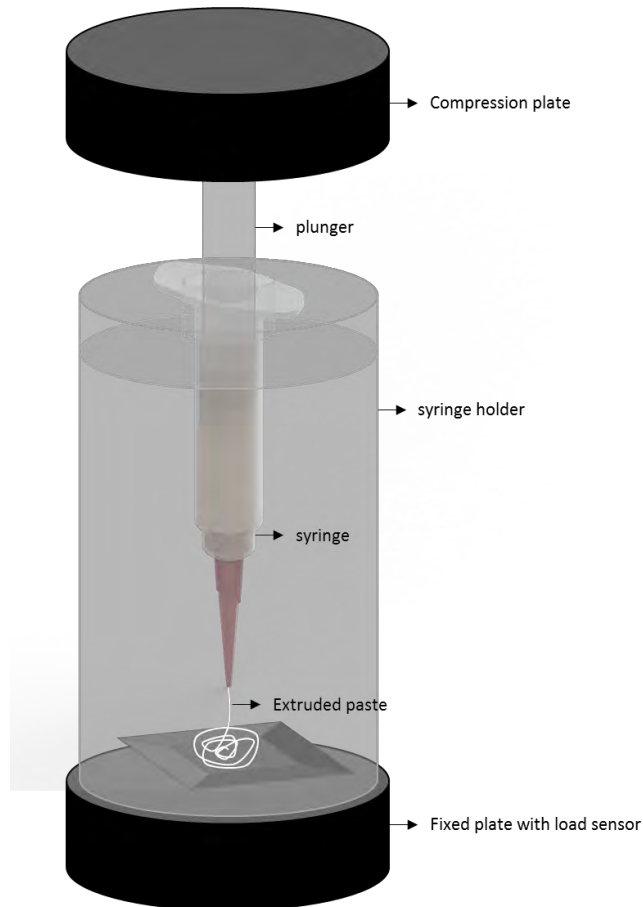


Figure 4-7 Schematic view of the injectability test.

Ginebra et al.[43] described a simple test consisting in placing a syringe filled with a cement in a support between two compression plates of a universal mechanical testing machine (as described in Figure 4-7) and recording the load needed for the paste to flow at a constant rate of extrusion. At the same time this allowed to measure the proportion of the initial paste introduced in the syringe that had been extruded if not totally at least partially, calculating the percentage of injectability which characterizes empirically the injection behavior of a determined formula of CPC.

Injectability of calcium phosphate cements:
Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

Notwithstanding, the ideal injectable calcium phosphate cement should be totally injectable and should not present phase separation phenomenon in order not to compromise its clinical application[41].

A cement paste is composed of two phases, since it is a suspension of particles in a fluid. In the case of calcium phosphate cements, since they are hydraulic cements, the fluid phase is water or an aqueous solution. The first parameter to influence the injectability of such a composite fluid is its solid volume fraction (SVF). When the SVF is reduced sufficiently, interactions between particles are limited and the fluid dominates the flow behavior of the paste making it easier to extrude but augmenting the permeability of the paste and *in fine* reducing the cement mechanical properties as demonstrated when increasing the LPR [44].

In a biphasic paste containing particles in a liquid, the fluid phase is potentially able to flow between the particles, leading to the separation of the two phases. In this respect, another parameter influencing the injectability of CPCs is the permeability of the powder with regards to the fluid as described by O'Neill et al. [45]. Permeability should be reduced as much as possible in order to avoid phase separation, in a phenomenon known as filter pressing. Bohner and Baroud identified this phenomenon that strongly affects its injectability [47] and leads to a gradual reduction of the liquid to powder ratio (L/P) inside the barrel of the syringe, first at the plunger and results in an increase of the L/P of the extrudate material [45].

In order to reduce the permeability the SVF should be increased, although this can also reduce the injectability if particle interactions are increased to an excessive proportion.

Increasing the liquid phase viscosity augments the pressure needed to make the liquid flow in between the particles of the solid phase, thus reducing also the phase separation likelihood. Several polymeric additives can be used in the liquid phase to increase the viscosity of the cement paste. However, only biocompatible polymers can be selected since CPCs are intended to be directly implanted in the body. Among others, polysaccharides [46](Chitosan,hydroxyethyl cellulose, sodium alginate etc.), synthetic polyethers (PEO, PPO, and poloxamers)[47] and polypeptidic polymers such as collagen or gelatin[48] have been used for this purpose. Polymeric additives drastically increase the injection force to extrude the paste which at times is detrimental to the overall clinical handling.

Particle size has also been identified as a parameter influencing the injectability of calcium phosphate cements and pastes. Even though reducing particle size is described by Jack et al. [49] as increasing the injectability, probably by reducing the permeability of the powder due to a higher specific surface area that generates

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

more contact between both phases, it also can provoke particle agglomeration that in turn hinder the injectability. Furthermore reducing particle size also increases the paste viscosity and thus increases injection force reducing the control of injection in parenteral injection of cements.

Modifying the particle size distribution by making it bimodal or by broadening it especially with fine particles is another method employed to increase the SVF thus reducing the permeability of the powder. Some authors have added fine particles to the paste improving the injectability [50] of the cement and others have tried to add larger particles of standardized beads of other materials without clear improvement of the injectability[51] or even reducing it [52].

Reducing colloidal interactions can also be beneficial to the injectability of CPCs. Ions that present several negatively charged functional groups like carboxylates can be added to the liquid phase to improve the cement's injectability. For instance citrate[53] or hexametaphosphate [54] ions were already used for rheological enhancement of CPCs.

Another interaction between particles that influences the injection behavior is the friction between particles. Most calcium phosphates powders are irregular are composed of irregularly shaped particles that are highly rough generating important particle to particle friction. This friction is further increased when the SVF is high which indicates that increasing the LPR is one of the methods indicated to reduce the friction. On another ground, using particles with low aspect ratios and roughness can improve substantially the injectability as demonstrated by Ishikawa et al. [55], however in the case of spherical particles of α -TCP their obtention requires processes that do not allow the same level of reactivity as much as milling, such as for instance flame spraying, increasing substantially CPCs' setting time and hindering their clinical application.

In summary, the different strategies that have been explored to improve CPCs' injectability can be classified as follows: i) tuning the particle size, particle size distribution or particle shape [45]; ii) modifying the surface electrostatic charge of the initial solid phase reducing flocculation and aggregation phenomena [36], [56]–[60], and iii) stabilizing the powder-liquid mixture by either reducing the permeability of the powder or by increasing the viscosity of the liquid phase thus making its exudation more difficult by the filter pressing phenomenon [39], [43], [61]–[64].

However, it has to be kept in mind that injectability is not the only requirement a CPC must fulfill. Other clinical requirements should be kept in mind, and other properties such as paste cohesion, setting time, mechanical strength or

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

handeability (need for complex devices to prepare the cement as opposed to premixed cements) should not be disregarded in order to obtain a safe and efficacious CPC.

4.3.2 Robocasting

Among the several solid freeform fabrication techniques that can be applied to CPCs direct write assembly techniques are probably the most interesting for bone regeneration applications. Other routes have been explored using CaP low-temperature reactions, like powder-bed based 3D printing, but the specific complexity of the process related to powder characteristics and layer establishment, the material waste and accuracy as well as the need to employ a depowdering process and the poor versatility in terms of material types limits the reach of this technique [65].

In contrast, direct-write assembly techniques[66] offer the ability to design and rapidly fabricate ceramic materials with complex 3D structures required for structural [67], [68], electrical [69] and biomaterial [70]–[73] applications. The technique involves materials assembly through a layer-by-layer process. Furthermore it allows to digitally design (CAD) from medical imaging data (CT-Scan, CBCT or NMR) a bone graft that perfectly fits to the patient's defect.

Several techniques are currently under investigation including direct ink-jet printing [74], hot-melt printing [75] and robotic deposition (or robocasting) [76]. This nascent area is part of a growing field known as solid freeform fabrication [77] that provides an enabling technology for forming materials without the use of expensive tooling, dies or molds.

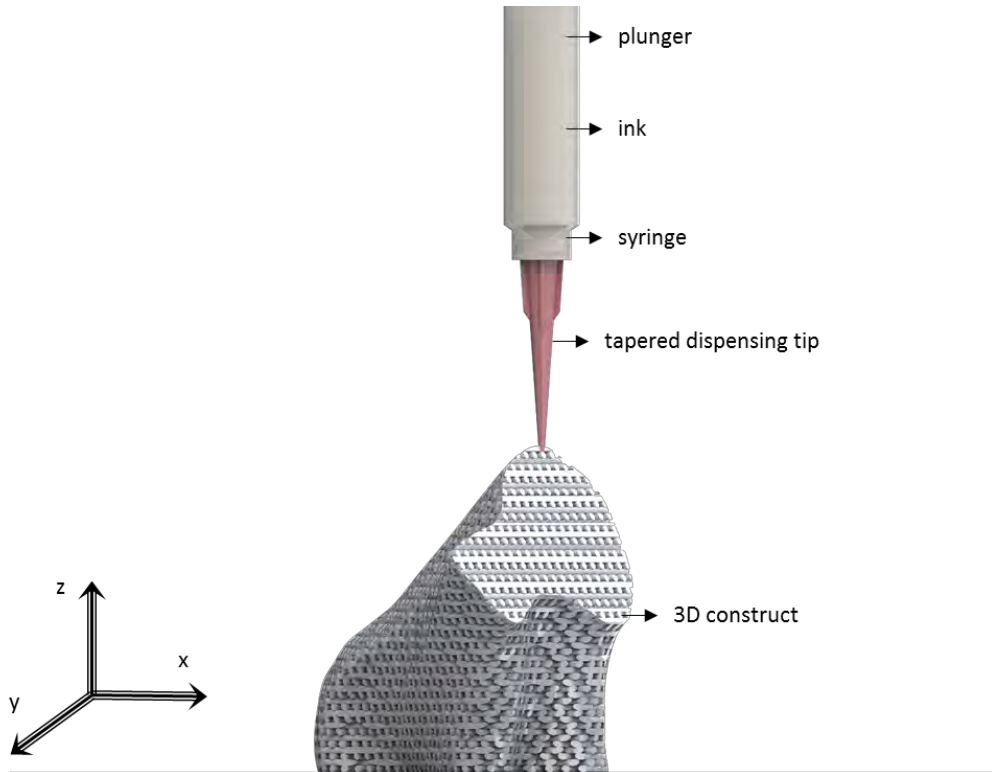


Figure 4-8 Schematic view of the robocasting process.

Robocasting consist in using a 3D motion controlled dispenser to draw with a continuous strand of material a 3D structure with desired dimensions. The technique relies on a perfect coordination between the speed of the dispenser movement and the dispensing flow of material. Nonetheless the material properties must be suitable for such a demanding technique. First the ink should be a pseudoplastic fluid with a low injection force. Furthermore, the material should maintain its shape after injection and contact with a non-bonding substrate, and be able to sustain itself without bending of the strands between two contact points.

Non-reactive inks

Non-reactive inks are stable pseudoplastic fluids that can be stored before printing, they are composed of non-reactive powders and a binder solution containing water or another solvent. Robocasting of non-reactive inks has been employed to produce HA and β -TCP scaffolds from a colloidal ink based on polyacrylate (PAA) and polyethyleneimine (PEI) [78], [79][80], [81] as well as poloxamer binder[71].

However the use of non-reactive inks implies a physical post processing step in order to consolidate the scaffold [79]. In most cases this physical consolidation step corresponds to a sintering process in which the part is heated first to a temperature

Injectability of calcium phosphate cements:
Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

at which the binder is degraded and subsequently to a higher temperature at which the solid-state diffusion is increased (usually more than half of the melting temperature of the material). At such a high temperature the particles bound together to give the part its mechanical integrity. Sintering can suppress nano and microporosity if not carefully controlled because it is driven by the diffusion mass transport to the pores of the green powder compact thus impairing some key biological features of the biomaterial such as protein adsorption and wettability. Furthermore the same phenomenon has a macroscopic direct consequence consisting in a substantial shrinkage (up to 30%), which can be anisotropic leading to a bad accuracy and dimension predictability. The former parameters are of paramount importance for the design of anatomically fitted scaffolds. Shrinkage can also produce residual stresses that hinder mechanical properties of the constructs. Overall, sintering is a process that is time and energy consuming and can lead to functional impairing of the biomaterials that compose the scaffold.

Reactive inks

Reactive inks can either be unstable mixture whose solid and liquid phase react together in order to produce a solid body (i.e. cement slurry) [82] or a mixture of a reactive solid phase together with an inert binder allowing to have a stable ink [83] whose reaction can be triggered *post printing* by introducing the corresponding reactant. Binder selection is of utmost importance since it influences the rheological, chemical and biological response of the ink and *in fine* of the scaffold. Binders are chosen first for their ability to induce a pseudoplastic behavior of the ink, some hydrogels and other complex fluids such as emulsions exhibit these flow properties allowing the printed layers to retain their shape and withstand the weight of superimposed layer of material. Furthermore the binder must be biocompatible, in order not to induce adverse reactions. Gelatine[82], cellulose esthers solution [84], sodium alginate[85] and poloxamers[86] [86] have been used as hydrogel binders for the production of reactive inks and this approach is included within the scope of the present thesis. In the eventuality that the binder does not possess a specific biological function it is preferable to eliminate it by a washing step in order to avoid hindering interactions between the host's tissue and the mineral part of the scaffold. Finally the main advantage of reactive inks is that they eliminate the need for a high temperature sintering step and allow to be consolidated under mild conditions. This way the physicochemical characteristics of low temperature apatite such as the high specific surface area and the microstructure as well as the micro/nano porosity are preserved. Furthermore the energy needed for the consolidation of the scaffold is reduced drastically and shrinkage is limited

Injectability of calcium phosphate cements:

Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

considerably since the setting or curing reaction does not affect the dimensions of the part especially in the case of calcium phosphate cements[87] based inks.

Lode et al. have employed lipid based CPC formula in order to produce scaffolds by robocasting [83] under mild conditions using α -TCP as the solid phase, obtaining CDHA scaffolds with properties closer to those of bone apatite. However the use of lipid based binder, which does not react with α -TCP, delays considerably the hardening of the scaffolds because it hinders or at least delays water to enter in direct contact with α -TCP, this resulting in poor compressive strength.

Other researchers have used magnesium phosphate cements [84] in a two step process in order to harden the scaffold through a cementitious reaction. Recently another approach was proposed [86] that combines 3D printing and electric field guiding of the extrudate based on a solution of poly ϵ -caprolactone in which α -TCP particles are dispersed. The electrodes were placed on the platter and on the syringe this way an electrical potential was applied between the syringe tip and the platter on which the strands were deposited, the poly ϵ -caprolactone / α -TCP ink then solidified after solvent evaporation and the α -TCP hydrolysed and reprecipitated into CDHA after scaffolds were immersed in water. The obtained scaffolds exhibit a good potential for tissue engineering especially because of their mechanical properties since they are less brittle than purely inorganic materials.

In summary, reactive inks open new perspectives for the fabrication of scaffolds for bone regeneration since they allow to obtain scaffolds with controlled architecture and porosity with biomaterials that are closer to the mineral phase of bones than those obtained at high temperature. Furthermore they allow combining the inks with biologically active substances and cells, which constitute the base of multifunctional bioinks.

In the following sections the three papers constituting the core of this thesis are included, followed by a discussion about the relevance of the results obtained. Moreover a patent that also resulted from this PhD is included as an Annex.

Papers

Injectability of calcium phosphate cements:
Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

Paper I: Relevance of the setting reaction to the injectability of tricalcium phosphate pastes

ATTENTION!

**Pages 36 to 47 of the thesis, containing the texts mentioned above,
are available at the editor's web**

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706112005788>

Injectability of calcium phosphate cements:
Application to minimally invasive surgical procedure and 3D printing

Paper II: Self-hardening and thermoresponsive alpha tricalcium phosphate/pluronic pastes

ATTENTION!

Pages 49 to 61 of the thesis, containing the texts mentioned above, are available at the editor's web

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706116306407>

Paper III: Robocasting of biomimetic hydroxyapatite scaffolds using self-setting inks

ATTENTION!

Pages 63 to 85 of the thesis, containing the texts mentioned above, are available at the editor's web

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/tb/c4tb00438h#!divAbstract>

10. Annex. Patente de invención: Cemento inorgánico, inyectable y termosensible para reconstrucción ósea: preparación y uso.

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 553 302**

21 Número de solicitud: 201430644

51 Int. Cl.:

A61L 27/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

05.05.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.12.2015

Fecha de la concesión:

07.09.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.09.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070361

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
(100.0%)****Jordi Girona 31
08034 Barcelona (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**MONTUFAR JIMENEZ, Edgar Benjamin;
MAAZOUZ, Yassine;
PASTORINO, David y
GINEBRA MOLINS, Maria Pau**54 Título: **CEMENTO INORGÁNICO, INYECTABLE Y TERMOSENSIBLE PARA RECONSTRUCCIÓN ÓSEA: PREPARACIÓN Y USO.**

57 Resumen:

Cemento inorgánico, inyectable y termosensible para reconstrucción ósea: preparación y uso.

Cemento inorgánico, inyectable y termosensible para aplicaciones biomédicas: preparación y uso.

Se propone la preparación de un cemento termosensible inyectable con aplicaciones clínicas en cirugía ósea y odontología mínimamente invasiva, basado en mezclas autofraguables de óxido de magnesio, fosfatos de calcio, sodio o amonio, carbonatos de calcio, sulfatos de calcio u otras sales inorgánicas con un hidrogel de poloxámero. Este cemento presenta como propiedad principal un efecto termosensible. Asimismo, presenta una alta cohesión en contacto con fluidos a temperatura fisiológica, acompañada de una disminución de la fuerza necesaria para su inyección con la temperatura.

Se indica la utilización del cemento para aplicaciones óseas y dentales, así como el llenado de defectos óseos. El cemento está especialmente indicado en casos en los que fuera necesario un uso mínimamente invasivo.

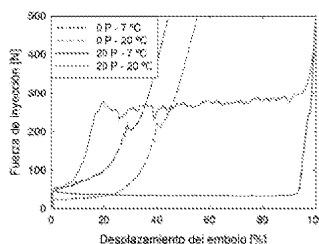


Fig. 1

ES 2 553 302 B1

ES 2 553 302 B1

DESCRIPCIÓN

Cemento inorgánico, inyectable y termosensible para reconstrucción ósea: preparación y uso.

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a biomateriales para la regeneración de tejidos duros: huesos y dientes. Estos materiales se pueden preparar en forma de gránulos, cementos, recubrimientos, cerámicas densas o porosas, etc. Entre otras aplicaciones se pueden aplicar para rellenar cavidades óseas, defectos craneales o cavidades después de remover un tumor, llenar espacios vacíos después de una fractura múltiple, rellenar huecos después de quitar un diente, aumentar la cantidad de hueso antes de colocar un implante dental, fijar tornillos cuando se colocan placas metálicas, estabilizar fracturas óseas o recubrir prótesis e implantes.

10 Se propone un cemento inorgánico completamente inyectable por lo que es especialmente adecuado para procedimientos médicos y veterinarios de mínima invasión quirúrgica. Sin embargo, también se puede usar en cirugía tradicional. En particular, el cemento presenta propiedades termosensibles, es decir, ciertas propiedades como la cohesión, la fuerza de inyección o el tiempo de fraguado se pueden modular controlando la temperatura de la pasta. Por otro lado, el producto final de la reacción de fraguado, dependiendo de la composición de partida, puede comprender fosfatos de calcio, como hidroxiapatita, hidroxiapatita deficiente en calcio, brushita o monetita, con gran similitud composicional y estructural con la fase mineral de los huesos y dientes, o bien otras sales inorgánicas como fosfatos de magnesio, carbonatos de calcio o sulfatos de calcio con una resistencia mecánica adecuada para aplicaciones óseas y dentales. Asimismo, el cemento puede actuar como soporte para la liberación controlada de fármacos (*Drug Delivery system*) y para el crecimiento celular en ingeniería de tejidos (*Tissue Engineerings scaffolds*). La presente invención se refiere también a procedimientos para la obtención de dichos biomateriales.

25 Esta invención también se refiere a un procedimiento para la preparación del citado cemento y al uso de dicho cemento para aplicaciones óseas y dentales.

Estado de la técnica anterior

30 Desde mediados de los años ochenta, la comunidad científica ha realizado importantes avances en el campo del diseño y la fabricación de nuevos materiales para la sustitución y la regeneración de tejidos biológicos mineralizados. Un tipo de materiales que ha sido ampliamente estudiado son los materiales basados en sales inorgánicas, como fosfatos de calcio o de magnesio, sulfatos de calcio o carbonatos de calcio. De entre las distintas formas en las que se pueden presentar dichos materiales, los cementos merecen especial atención debido a ciertas ventajas intrínsecas como su moldeabilidad y perfecta adaptación a la cavidad ósea, la posibilidad de inyectarlos utilizando técnicas mínimamente invasivas y su capacidad de endurecer una vez implantados dentro del cuerpo. Es de destacar que en el caso de los cementos de fosfato de calcio se puede obtener como producto de la reacción hidroxiapatita, que presenta numerosas similitudes con el componente óseo inorgánico natural, tales como la composición química y el tamaño nanométrico de los cristales.

40 Los recientes desarrollos en cirugía mínimamente invasiva han reducido el riesgo que corre el paciente durante la intervención quirúrgica y el costo hospitalario de la misma. Esta nueva técnica quirúrgica requiere de nuevos materiales de regeneración ósea totalmente inyectables, capaces de endurecer *in situ* y de regenerar el hueso dañado. A pesar de la reconocida capacidad de los cementos inorgánicos para rellenar y/o regenerar satisfactoriamente el hueso dañado, también presentan ciertas limitaciones. En primer lugar, la inyectabilidad de las pastas de cementos inorgánicos es limitada. En segundo lugar, el tiempo de fraguado de los cementos inyectables tiende a ser mayor al de los cementos no inyectables. Finalmente, la tercera limitación es la baja resistencia mecánica de los cementos inyectables.

ES 2 553 302 B1

Breve explicación de la invención

A diferencia de los trabajos y patentes mencionadas, esta invención presenta un cemento híbrido inorgánico/orgánico de uso biomédico cuyas propiedades como la cohesión, el tiempo de fraguado y la inyectabilidad se pueden modular controlando la temperatura. La pasta se basa en la mezcla de sales inorgánicas autofraguables con agua o soluciones acuosas, con o sin la adición de aditivos que aceleren o retarden el fraguado del cemento, y la incorporación de un poloxámero en la fase líquida o en la fase sólida, para proporcionar el carácter termosensible deseado. Las aplicaciones del cemento son aplicaciones clínicas, óseas o dentales, tanto tradicionales como de cirugía mínimamente invasiva. Dicho cemento presenta varias propiedades intrínsecas que le dotan de especial interés. La primera característica a destacar del material es que, sin importar la temperatura inicial de la pasta, el cemento tiene cohesión cuando es inyectado en un medio cuya temperatura es 37 °C. Esta característica hace posible que el cemento fragüe y endurezca *in situ* sin desintegrarse ni sufrir ninguna erosión. La segunda característica relevante es que las pastas de cemento con poloxámero son totalmente inyectables aplicando fuerzas inferiores a las usadas para inyectar cementos acrílicos, y no presentan separación de fases. El punto más importante a destacar es que la fuerza de inyección disminuye con la disminución de la temperatura de la pasta. La fuerza de inyección alcanza un mínimo y se mantiene constante por debajo de 15 °C. Además, las pastas presentan tiempos de fraguado cortos comparados con otros cementos que incorporan hidrogeles para mejorar la inyectabilidad. El cemento endurece o bien por la formación y entrecruzamiento de cristales de las fases que se producen en la reacción de fraguado, o por la formación de una fase amorfa, que dan lugar a un aumento de la resistencia mecánica.

Todas estas características en su conjunto hacen que el cemento aquí presentado sea idóneo para cirugía mínimamente invasiva donde se requiera regenerar lesiones óseas o dentales, pero también es apto para cirugía tradicional, tanto en medicina como en veterinaria. Modular la fuerza de inyección permite al cirujano inyectar el material con la mayor precisión posible y con el mínimo esfuerzo, mientras que la cohesión de la pasta asegurara el éxito del procedimiento quirúrgico logrando que la pasta fragüe en la posición deseada, alcanzando una resistencia mecánica razonable y similar al hueso trabecular. Finalmente, el producto de fraguado del cemento es completamente biocompatible, y en algunos casos específicos puede llegar a ser osteoconductor y reabsorbible, por lo que se garantiza la regeneración del tejido dañado.

La composición del material se ha optimizado con la finalidad de garantizar los aspectos mencionados en el párrafo anterior. La preparación del cemento requiere de un polvo o fase sólida compuesto por una o varias sales inorgánicas y una fase líquida compuesta principalmente por agua o algún solvente biocompatible donde se pueda disolver el poloxámero. La mezcla de ambas fases se puede llevar a cabo manualmente o en un mezclador de alta energía, a una temperatura inferior o igual a la temperatura ambiente. La temperatura de la fase sólida y/o de la fase líquida en el momento de la mezcla puede ser igual o inferior a 25°C, preferiblemente inferior a 12°C. La pasta obtenida se puede implantar directamente en el paciente mediante cirugía tradicional o se puede colocar en una jeringa para ser implantada mediante cirugía mínimamente invasiva. Alternativamente, la pasta se puede colocar en una jeringa o dispositivo similar para su posterior congelación, preferentemente a temperaturas iguales o inferiores a -20°C, para su almacenamiento, y posteriormente se descongela preferentemente a menos de 12°C para su utilización en la aplicación clínica. Una vez implantada la pasta de cemento endurecerá *in situ* debido a su buena cohesión a temperatura fisiológica y producirá un cuerpo rígido con resistencia a la compresión similar a la del hueso trabecular.

Es importante tener en cuenta que para la utilización del cemento *in vivo*, el polvo y el líquido tienen que haber sido esterilizados previamente. Además, se requiere una zona de trabajo

ES 2 553 302 B1

La inyectabilidad de los cementos inorgánicos se puede mejorar aumentando la relación líquido-polvo de mezclado. Sin embargo, esta alternativa retarda el fraguado del cemento, facilita la desintegración de la pasta al entrar en contacto con un medio líquido y disminuye considerablemente la resistencia mecánica. Otra alternativa es la incorporación de un polímero, por lo general un hidrogel, en la fase líquida del cemento. En este caso la inyectabilidad y la cohesión de las pastas aumentan considerablemente pero también aumenta significativamente la fuerza requerida para inyectar la pasta. Además, la incorporación del hidrogel produce efectos colaterales como el aumento del tiempo de fraguado y la disminución de la resistencia mecánica. Los hidrogeles utilizados para mejorar la inyectabilidad de los cementos inorgánicos de uso biomédico son en su mayoría de origen natural como la celulosa y sus derivados, el quitosano, el colágeno, la gelatina, el alginato de sodio o el ácido hialurónico. Precisamente debido a su origen natural se debe tener especial precaución en evitar posibles rechazos inmunológicos o variaciones en las propiedades entre los diferentes lotes del hidrogel.

Una familia de polímeros de origen sintético, y por tanto sin problemas asociados como el rechazo inmunológico o la variabilidad de sus propiedades, son los poloxámeros. Los poloxámeros son copolímeros de tres bloques compuestos por una parte central hidrofóbica de poli (óxido de propileno) flanqueada por dos partes hidrófilas laterales de poli (óxido de etileno) [1]. En función de la longitud de las tres cadenas existen diferentes tipos de poloxámeros. En general los poloxámeros son considerados surfactantes no iónicos. Al aumentar la concentración en agua, las moléculas de este copolímero se asocian para formar micelas y si la concentración sigue aumentando son capaces de formar hidrogeles. La concentración a la cual se forma el hidrogel depende del tipo de poloxámero y de la temperatura. En general, a bajas temperaturas las soluciones de poloxámeros poseen una baja viscosidad y se comportan como líquidos, mientras que a altas temperaturas su viscosidad aumenta y se comportan como hidrogeles. Los poloxámeros son biocompatibles, no alteran las funciones biológicas de manera significativa y son excretados por vía renal. Por estas razones los poloxámeros se utilizan en gran variedad de aplicaciones biomédicas como sistemas para la liberación controlada de fármacos, excipientes en medicamentos o agentes embolizadores temporales, entre muchas otras [1].

En un ámbito muy distante del desarrollo de cementos inorgánicos de uso biomédico en cirugía mínimamente invasiva, los poloxámeros se han utilizado por sus características reológicas en procesos de impresión tridimensional directa para formar tintas cerámicas para la fabricación por moldeo robotizado aditivo de andamios para ingeniería de tejidos. En particular los poloxámeros se han mezclado con fosfatos de calcio no reactivos como vidrios bioactivos, hidroxiapatita, fosfato tricálcico beta o mezclas de los dos últimos [2]. El hecho de que estas tintas no tienen la capacidad de fraguar como un cemento tiene tres consecuencias importantes. La primera es que el tiempo transcurrido entre el mezclado y la impresión de las tintas no afecta a la fuerza requerida para la extrusión. La segunda es que la consolidación de las estructuras fabricadas se realiza mediante sinterización entre 700 y 1400 °C, lo cual implica que a pesar de que la similitud composicional con la fase mineral de los huesos y dientes se mantiene, la similitud microestructural se pierde, produciendo materiales difíciles de reabsorber *in vivo*. Finalmente, los andamios fabricados son rígidos y poseen formas y tamaños predefinidos, por lo que no pueden ser implantados mediante técnicas quirúrgicas no invasivas.

Debido a su capacidad de gelificar al aumentar la temperatura, su solubilidad en medios acuosos, su biocompatibilidad y la capacidad de ser excretados por vía renal, los hidrogeles de poloxámero se utilizan como agente embolizador temporal en el campo de la medicina cardiovascular [3]. Sin embargo, las propiedades termosensibles de los poloxámeros no se han explotado en cirugía ortopédica u oral, ni mucho menos en formulaciones de cementos inorgánicos de uso biomédico. El uso de poloxámeros en cementos de fosfatos de calcio se limita a su carácter tensoactivo para evitar la agregación del polvo del cemento [4] o para la formación de espumas [5].

ES 2 553 302 B1

estéril para evitar la contaminación de los reactivos en el momento de preparación e introducción de la pasta.

Explicación detallada de la invención

5 Esta invención presenta un cemento inorgánico termosensible para aplicaciones óseas y/o dentales, tanto en medicina como en veterinaria. El cemento en cuestión posee varias propiedades específicas que le dotan de especial interés. Con la finalidad de potenciar dichas propiedades, se han optimizado las condiciones de preparación del material, tal como se detalla a continuación.

10 En primer lugar el cemento objeto de esta invención posee propiedades termosensibles, que no han sido descritas anteriormente en ninguna otra formulación de cemento de uso biomédico de fosfato de calcio o magnesio, carbonato o sulfato de calcio. En otras palabras, ciertas propiedades de la pasta de cemento como la fuerza de inyección, la cohesión o el tiempo de fraguado, se pueden modular controlando la temperatura de la pasta. Esto se consigue sin comprometer la biocompatibilidad del material mediante el uso de un poloxámero como aditivo
15 en la formulación del cemento.

En segundo lugar, incluso con un bajo contenido de líquido en la pasta y a diferencia de otros cementos totalmente inyectables que incorporan hidrogeles en su fase líquida, la fuerza de inyección del cemento presentado en esta invención es relativamente baja (~50 N) y fácil de alcanzar inyectando a mano. Esto se consigue porque la fuerza de inyección disminuye al
20 disminuir la temperatura de la pasta. Esta propiedad permite al cirujano inyectar el material con la mayor precisión posible y con el mínimo esfuerzo. Las temperaturas de trabajo para obtener las fuerzas de inyección más bajas son temperaturas ligeramente inferiores a la temperatura ambiente de un quirófano (preferentemente entre -5 y 18 °C), que se pueden conseguir fácilmente con el uso de sistemas de refrigeración, baños térmicos, neveras u otros dispositivos
25 similares o equivalentes, de fácil acceso en hospitales, clínicas o consultas médicas.

En tercer lugar, es importante señalar que la cohesión de las pastas del cemento aquí presentado aumenta con el incremento de la temperatura del medio donde son inyectadas. Es de particular interés que, sin importar la temperatura inicial, las pastas del cemento aquí
30 presentado tienen cohesión justo después de ser mezcladas e inyectadas en un medio a temperatura fisiológica (37 °C). Esto asegura que una vez implantada la pasta de cemento en el cuerpo del paciente, ésta no se desintegrará sino que mantendrá la forma y endurecerá *in vivo*, garantizando el éxito del procedimiento quirúrgico.

En cuarto lugar, el tiempo de fraguado del cemento es aceptable para aplicaciones clínicas, dando suficiente margen de tiempo al cirujano para implantar el cemento con una buena
35 inyectabilidad de la pasta, y endurece rápidamente una vez implantado. El endurecimiento del cemento se debe a dos procesos que actúan en paralelo, uno es la reacción de fraguado del cemento y el otro es la gelificación del poloxámero con el aumento de la temperatura debido al calor corporal.

En quinto lugar, la incorporación del poloxámero no afecta al producto de la reacción de fraguado del cemento, el cual en el caso de un cemento de fosfato de calcio y dependiendo de la composición específica del cemento puede ser hidroxiapatita deficiente en calcio, hidroxiapatita, brushita, monetita, u otro fosfato de calcio. En particular, estos fosfatos son
40 similares a la fase mineral de los huesos y dientes. Lo que hace a los cementos de fosfatos de calcio biocompatibles, osteoconductivos y reabsorbibles, por tanto poseen un gran potencial para regenerar lesiones en tejidos duros, huesos y dientes, de cualquier vertebrado. Por otro lado, en el caso de otros cementos óseos inorgánicos, el producto de fraguado comprende fosfatos de magnesio, carbonatos de cálcico, sulfatos de calcio o mezclas de ellos. El producto
45 del fraguado puede ser tanto cristalino como amorfo.

ES 2 553 302 B1

En sexto lugar, la resistencia mecánica del cemento fraguado puede llegar a ser superior a la del hueso trabecular. En particular los cementos optimizados tienen resistencias similares a varios cementos óseos inorgánicos disponibles comercialmente (resistencia a la compresión de alrededor de 30 MPa).

- 5 El procedimiento de preparación del cemento objeto de esta patente requiere de un polvo compuesto por una o varias sales inorgánicas capaces de endurecer mediante una reacción de fraguado al entrar en contacto con la fase líquida. La fase líquida se compone preferentemente de agua, poloxámero en solución y puede incorporar o no, según sea necesario, un aditivo para acelerar o retardar la reacción de fraguado. Además de agua también se pueden usar otros
- 10 líquidos biocompatibles donde el poloxámero sea soluble y el cemento sea capaz de fraguar. Dado que la distribución de tamaños de partícula del polvo de cemento es un parámetro que controla la inyectabilidad de las pastas, el control del tamaño de partícula es un factor clave de esta invención. El tamaño de partícula óptimo para mejorar la inyectabilidad sin retardar el fraguado, ni perjudicar la resistencia mecánica del cemento se puede conseguir preferentemente mediante molienda de los componentes del polvo, tanto en seco como en húmedo, usando un líquido libre de agua como por ejemplo, etanol o acetona, entre otros. El carácter termosensible del cemento se consigue incorporando poloxámero en solución en la fase líquida o en forma de polvo en la fase sólida del cemento. Se puede usar cualquier variedad de poloxámero dependiendo de las propiedades particulares que se quieran alcanzar.
- 20 La mezcla del polvo con la fase líquida se puede llevar a cabo a varias relaciones líquido-polvo, aunque se prefieren relaciones bajas para mejorar la resistencia mecánica del cemento fraguado, y a varias temperaturas de mezclado, preferentemente temperaturas por debajo de la temperatura ambiente para poder incorporar mayor cantidad de polvo en la solución de poloxámero. Se recomienda que las temperaturas de la fase sólida y/o de la fase líquida antes del mezclado sean inferiores a 25°C y preferentemente inferiores a 12°C. El mezclado se puede realizar a mano o con un dispositivo mecánico de cualquier tipo. Para obtener pastas más homogéneas en el menor tiempo posible se prefiere un dispositivo mecánico de mezclado de alta energía, del tipo mezclador planetario. La pasta obtenida se puede implantar directamente en la lesión ósea o dental a tratar, o se puede colocar en el interior de una jeringa u dispositivo similar para su posterior implantación mediante inyección. Alternativamente, una vez colocada la pasta en el interior de una jeringa o dispositivo similar se puede congelar, preferentemente a temperaturas iguales o inferiores a -20 °C, para su almacenamiento, y posterior descongelación, preferentemente a menos de 12 °C para su utilización en la aplicación clínica.
- 35 Los cementos inorgánicos termosensibles tienen interés para aplicaciones óseas y dentales, tanto en medicina como en veterinaria, especialmente en situaciones donde se necesita incrementar la masa de hueso o rellenar una cavidad ósea o dental. Dichos cementos pueden ser utilizados para rellenar cavidades óseas, defectos craneales o cavidades después de remover un tumor, llenar espacios vacíos después de una fractura múltiple, rellenar huecos después de quitar un diente, aumentar la cantidad de hueso antes de colocar un implante dental, fijar tornillos cuando se colocan placas metálicas, fijar dispositivos de fijación de fracturas, estabilizar fracturas óseas o recubrir prótesis e implantes, entre otras. Asimismo, el cemento puede actuar como soporte para la liberación controlada de fármacos (*Drug Delivery system*) o de sustrato para el crecimiento celular en ingeniería de tejidos (*Tissue Engineerings scaffolds*).
- 45

Preparación de un cemento inorgánico termosensible de uso biomédico

- Con la finalidad de ilustrar de forma práctica la invención a continuación se indican los reactivos posibles para la preparación de cementos inorgánicos inyectables y termosensibles de uso biomédico. Sin embargo, las posibilidades no se limitan a estos ejemplos. En el caso de
- 50 cementos de fosfatos de calcio la fase en polvo del cemento comprende fosfato tricálcico alfa, mezclas de fosfato tetracálcico con fosfato dicálcico anhídrido o dihidratado, o bien mezclas de

ES 2 553 302 B1

fosfato tricálcico beta con fosfato monocálcico anhídrido o hidratado. Para cementos de fosfatos de magnesio la fase en polvo del cemento comprende mezclas de óxido de magnesio con una sal de fosfato, como fosfatos de sodio, potasio, amonio o sus mezclas. Para cementos de carbonato cálcico la fase en polvo del cemento comprende vaterita y/o carbonato de calcio amorfo. Para cementos de sulfato de calcio la fase en polvo del cemento comprende sulfato de calcio hemihidrato. En todos los casos mencionados la fase en polvo se encuentra preferentemente a una temperatura inferior a 25 °C, y más preferentemente inferior a 12 °C.

Como principal componente de la fase líquida se puede usar preferentemente agua destilada o agua bidestilada. Alternativamente se puede usar agua, soluciones acuosas salinas, fluidos fisiológicos simulados u otros líquidos donde el poloxámero sea soluble y el cemento sea capaz de fraguar. El poloxámero a utilizar puede ser cualquiera de los poloxámeros existentes aunque se prefieren, sin implicar ninguna limitación, los de alto peso molecular. El poloxámero se puede incorporar en forma de polvo fino molido en el polvo de cemento, aunque se prefiere su incorporación en solución en la fase líquida del cemento. Para favorecer el efecto termosensible del cemento se prefiere el uso de poloxámeros a una concentración tal que la temperatura de gelificación de la disolución sea cercana a la temperatura ambiente, como por ejemplo poloxámero 407 entre 10 y 30 % en peso. La temperatura de la fase líquida en el momento del mezclado debe ser inferior a 25°C y preferentemente inferior a 12°C.

A fin de conseguir una pasta totalmente inyectable, así como el máximo de resistencia mecánica del cemento, es necesario controlar el tamaño de partícula de los reactivos que conforman el polvo y el protocolo de mezclado con la fase líquida. En el caso del tamaño de partícula, el tamaño óptimo se puede alcanzar mediante molienda del polvo, tanto en seco como en húmedo, en este último caso usando un líquido libre de agua como por ejemplo, etanol o acetona, entre otros. La distribución de tamaños de partícula del polvo puede variar entre 0.1 y 80 µm, pero de preferencia tiene que ser menor a 20 µm. Alternativamente se puede realizar una separación de tamaños de partícula después de la molienda para conseguir la distribución de tamaños deseada. La mezcla del polvo con la fase líquida se puede llevar a cabo a diferentes relaciones líquido-polvo, entre 0,15 y 1,0 mL/g. Preferentemente se recomienda usar relaciones líquido-polvo entre 0,2 y 0,4 mL/g para mejorar la resistencia mecánica del cemento. El mezclado se puede realizar a mano o mediante un dispositivo mecánico de cualquier tipo. Para obtener pastas más homogéneas en el menor tiempo posible se prefiere un dispositivo mecánico de mezclado de alta energía, del tipo mezclador planetario. Se recomienda que las temperaturas la fase sólida y/o de la fase líquida antes del mezclado sean inferiores a 25°C y más preferentemente inferiores a 12°C. Se recomienda que la temperatura de mezclado sea preferentemente entre -5 y 20 °C. Bajo estas condiciones se obtiene una pasta con consistencia trabajable que se puede implantar directamente en la lesión ósea o dental, o se puede colocar en el interior de una jeringa u dispositivo similar para su posterior implantación mediante inyección. El tiempo transcurrido entre la preparación y la implantación de la pasta depende de la formulación específica del cemento y puede variar entre 5 a 60 minutos.

En referencia al carácter termosensible del material y para minimizar la fuerza necesaria para inyectar el cemento, la temperatura de la pasta en el momento de la inyección debe ser inferior a 25 °C. Preferentemente se recomienda que la pasta se encuentre entre -5 y 20 °C. Cualquier método disponible para enfriar la pasta puede ser utilizado. Como ejemplo, sin limitar las alternativas, se pueden usar sistemas de refrigeración, baños térmicos, neveras u otros dispositivos similares o equivalentes.

La pasta, una vez colocada en el interior de una jeringa o dispositivo similar también se puede congelar, preferentemente a temperaturas iguales o inferiores a -20 °C, para su almacenamiento, y posteriormente se descongela preferentemente a menos de 12°C para su utilización en la aplicación clínica.

ES 2 553 302 B1

Es importante tener en cuenta que para la utilización del cemento *in vivo*, el polvo y el líquido tienen que haber sido esterilizados previamente. Además, se requiere una zona de trabajo estéril para evitar la contaminación de los reactivos en el momento de preparación e introducción de la pasta.

5 **Realizaciones preferidas**

Los ejemplos que se incluyen a continuación son descritos con la finalidad de ilustrar de forma práctica la invención, sin la intención de limitar ni restringir las composiciones específicas que se recogen en los mismos y el procedimiento de preparación de la mezcla de ingredientes.

Ejemplo 1: Cemento de fosfato de calcio termosensible: control de la fuerza de inyección

10 150 g de fosfato tricálcico alfa se molieron en un tarro de ágata utilizando un molino planetario y las siguientes tres etapas de molienda: 1) 450 rpm durante 60 minutos con 10 bolas de ágata de 30 mm de diámetro; 2) 500 rpm durante 40 minutos con 10 bolas de ágata de 30 mm de diámetro; 3) 500 rpm durante 60 minutos con 100 bolas de ágata de 10 mm de diámetro. 2,5 g de Na_2HPO_4 y 20 g de poloxámero 407 se disolvieron en un volumen total de 100 mL de agua
15 destilada. La disolución de los componentes se llevó a cabo en un mezclador planetario de alta energía durante 30 minutos a 3000 rpm usando agua a 4 °C. La preparación de la pasta consistió en mezclar 5,714 g del polvo de fosfato tricálcico alfa con 2 ml de la disolución de Na_2HPO_4 y poloxámero 407 previamente enfriada a 0 °C. La mezcla se llevó a cabo en un mezclador planetario de alta energía durante 20 segundos a 1650 rpm.

20 La pasta obtenida se incorporó en una jeringa de 5 mL de capacidad y con una apertura de 2 mm de diámetro. Antes de inyectar la pasta de cemento las jeringas se colocaron durante 15 minutos en un baño de agua a diferentes temperaturas, de tal forma que la temperatura de la pasta en el momento de la inyección fue de 0, 7, 12, 15, 18 o 20 °C. Las jeringas a la temperatura indicada se colocaron en un soporte para realizar el ensayo de inyección. Este
25 ensayo consiste en medir la fuerza necesaria para inyectar la pasta a una velocidad de avance del émbolo de la jeringa de 15 mm/min. El ensayo se realizó en una máquina universal de ensayos mecánicos (MTS Bionix 858). El resultado del ensayo es la curva de inyectabilidad, la cual relaciona la fuerza necesaria para inyectar la pasta a una velocidad constante en función del desplazamiento del émbolo, este último expresado en porcentaje respecto al máximo recorrido posible.
30

La Figura 1 muestra las curvas de inyección para la pasta de cemento que contiene poloxámero 407 a 7 y 20 °C. La Figura 1 también muestra las curvas de inyección para la pasta de cemento sin poloxámero 407 a las mismas temperaturas. Sin poloxámero 407 la fuerza de inyección no se modificó considerablemente entre 7 y 20 °C (valor aproximado de 20 a 50
35 MPa). Sin poloxámero 407 la pasta se inyectó parcialmente, puesto que el émbolo únicamente alcanzó entre un 45 % y un 55 % del recorrido posible. La razón es el fenómeno conocido como separación de fases o filtrado por presión, el cual consiste en que el líquido es inyectado a través del polvo, por lo que la fracción de sólido en el interior de la jeringa aumenta durante el ensayo. El incremento de la fracción de sólido en la jeringa hace cada vez más difícil inyectar la pasta, requiriendo más fuerza para la inyección. En cambio, independientemente de la temperatura, con poloxámero 407 la pasta de cemento se inyectó completamente puesto que el émbolo alcanzó el máximo recorrido posible y visualmente no se observó pasta remanente dentro de las jeringas. Es interesante notar que, a pesar de que en todos los casos las pastas se inyectaron completamente, la fuerza requerida para inyectarlas fue significativamente
40 diferente entre 7 y 20 °C.
45

La Figura 2 resume los resultados de la fuerza requerida para inyectar las pastas de cemento termosensible a diferentes temperaturas (0, 7, 12, 15, 18 y 20 °C). Los valores se presentan como promedio y desviación estándar de al menos tres ensayos. La Figura 2 muestra que la fuerza requerida para inyectar la pasta disminuye al disminuir la temperatura. Se observa

ES 2 553 302 B1

también que para temperaturas de la pasta iguales o inferiores a 12 °C la fuerza para la inyección es mínima, tomando valores entre 30 y 60 MPa. A todas las temperaturas las pastas de cemento son completamente inyectables y no presentan en ningún caso señales de separación de fases.

5 Ejemplo 2: Cemento de fosfato de calcio termosensible: cohesión de las pastas

150 g de fosfato tricálcico alfa se molieron en un tarro de ágata utilizando un molino planetario y las siguientes tres etapas de molienda: 1) 450 rpm durante 60 minutos con 10 bolas de ágata de 30 mm de diámetro; 2) 500 rpm durante 40 minutos con 10 bolas de ágata de 30 mm de diámetro; 3) 500 rpm durante 60 minutos con 100 bolas de ágata de 10 mm de diámetro. 2,5 g de Na_2HPO_4 y 20 g de poloxámero 407 se disolvieron en un volumen total de 100 mL de agua destilada. La disolución de los componentes se llevó a cabo en un mezclador planetario de alta energía durante 30 minutos a 3000 rpm usando agua a 4 °C. La preparación de la pasta consistió en mezclar 5,714 ó 3,636 g del polvo de fosfato tricálcico alfa con 2 mL de la disolución de Na_2HPO_4 y poloxámero 407 previamente enfriada a 0 °C. La mezcla se llevó a cabo en un mezclador planetario de alta energía durante 20 segundos a 1650 rpm.

Inmediatamente la pasta obtenida se incorporó en una jeringa de 5 mL de capacidad y con una apertura de 2 mm de diámetro. Las jeringas se colocaron durante 15 minutos en un baño de agua a diferentes temperaturas, de tal forma que la temperatura de la pasta fue de 0, 7 o 18 °C. Una vez la pasta alcanzó la temperatura deseada esta se inyectó a mano en una solución de Ringer (0,9 % en peso de NaCl en agua) a diferentes temperaturas entre 0 y 37 °C. La cohesión de las pastas de determinó visualmente durante un máximo de 24 h, tiempo suficiente para el endurecimiento del cemento.

La Figura 3 muestra imágenes de la pasta inicialmente a 18 °C e inyectada en solución de Ringer a temperaturas entre 0 y 37 °C. Se puede observar que al aumentar la temperatura de la solución de Ringer la pasta inyectada retiene en mejor medida su forma de extrusión, lo que indica que la cohesión de la pasta aumenta con la temperatura del medio donde es inyectada. En particular, a 37 °C (temperatura fisiológica), la retención de la forma del cemento es completa, por lo que se puede inyectar con la seguridad de que el cemento conservará su integridad *in situ*. La Figura 4 muestra que la temperatura inicial de la pasta (0, 7 o 18 °C) no afecta la cohesión del cemento cuando es inyectado en solución de Ringer a 37 °C. La Figura 5 muestra que cementos sin poloxámero 407 no tienen cohesión en solución de Ringer a 37 °C. Por un lado, cuando poca cantidad de polvo (3,636 g) es mezclada con 2 mL de solución de Na_2HPO_4 al 2 % en peso, la pasta es tan líquida que se desintegra inmediatamente al entrar en contacto con la solución de Ringer. Por otro lado, cuando la cantidad de polvo es mayor (5,714 g), la pasta parece tener cohesión después de las primeras horas en contacto con la solución de Ringer, pero con el paso del tiempo la forma de extrusión pierde continuidad, dando lugar a varios fragmentos macroscópicos que aunque terminan endureciendo no mantienen su forma original. En cambio con poloxámero 407 las pastas de cemento endurecen manteniendo completamente su forma para las dos cantidades de polvo usadas.

40 Ejemplo 3: Fraguado y endurecimiento del cemento de fosfato de calcio termosensible

150 g de fosfato tricálcico alfa se molieron en un tarro de ágata utilizando un molino planetario y las siguientes tres etapas de molienda: 1) 450 rpm durante 60 minutos con 10 bolas de ágata de 30 mm de diámetro; 2) 500 rpm durante 40 minutos con 10 bolas de ágata de 30 mm de diámetro; 3) 500 rpm durante 60 minutos con 100 bolas de ágata de 10 mm de diámetro. 2,5 g de Na_2HPO_4 y 20 g de poloxámero 407 se disolvieron en un volumen total de 100 mL de agua destilada. La disolución de los componentes se llevó a cabo en un mezclador planetario de alta energía durante 30 minutos a 3000 rpm usando agua a 4 °C. La preparación de la pasta consistió en mezclar 5,714 g del polvo de fosfato tricálcico alfa con 2 mL de la disolución de Na_2HPO_4 y poloxámero 407 previamente enfriada a 0 °C. La mezcla se llevó a cabo en un mezclador planetario de alta energía durante 20 segundos a 1650 rpm.

ES 2 553 302 B1

Los tiempos de fraguado inicial y final se midieron mediante el ensayo de las agujas de Gilmore, según el cual el tiempo de fraguado inicial se define como el tiempo transcurrido desde el momento en que el polvo contacta con el líquido, hasta que una presión de 0,3 MPa no deja ninguna marca en la superficie del cemento, mientras que el tiempo de fraguado final se define como el tiempo transcurrido desde el momento en que el polvo contacta con el líquido, hasta que una presión de 5 MPa no deja ninguna marca en la superficie del cemento. El ensayo se realizó introduciendo la pasta del cemento en moldes de plástico cilíndricos de 10 mm de altura. El tiempo de fraguado inicial del cemento fue de 11,6 minutos y el tiempo final fue de 33,7 minutos.

- 10 Para determinar el producto final de la reacción de fraguado y la resistencia a la compresión del cemento se prepararon probetas del cemento de 12 mm de altura y 6 mm de diámetro en moldes de teflón. Dichos moldes se introdujeron en solución de Ringer (0,9 % en peso de NaCl en agua) y se mantuvieron a 37 °C durante 7 días. En la Figura 6 se presenta el diagrama de difracción de rayos X del cemento fraguado durante 7 días. Los máximos de difracción que se observan concuerdan con la ficha cristalográfica de la hidroxiapatita (JCPDS 09-0342). Esto indica que durante el fraguado el fosfato tricálcico alfa se hidroliza para formar hidroxiapatita. En particular, y de acuerdo a la relación Ca/P del fosfato tricálcico alfa usado como reactivo (Ca/P = 1,5), la hidroxiapatita formada corresponde a una hidroxiapatita deficiente en calcio. La resistencia a la compresión se midió utilizando una máquina universal de ensayos mecánicos, con una célula de carga de 10 kN, usando una velocidad de desplazamiento de mordazas de 1mm/min. La resistencia a la compresión del cemento termosensible fraguado fue de $28,4 \pm 5,1$ MPa. La densidad esquelética del cemento termosensible fraguado medida mediante picnometría de helio fue de $2,68 \text{ g/cm}^3$.

25 **Ejemplo 4: Almacenamiento de la pasta de cemento a baja temperatura: Congelación y descongelación**

- 150 g de fosfato tricálcico alfa se molieron en un tarro de ágata utilizando un molino planetario y las siguientes tres etapas de molienda: 1) 450 rpm durante 60 minutos con 10 bolas de ágata de 30 mm de diámetro; 2) 500 rpm durante 40 minutos con 10 bolas de ágata de 30 mm de diámetro; 3) 500 rpm durante 60 minutos con 100 bolas de ágata de 10 mm de diámetro. 2,5 g de Na_2HPO_4 y 20 g de poloxámero 407 se disolvieron en un volumen total de 100 mL de agua destilada. La disolución de los componentes se llevó a cabo en un mezclador planetario de alta energía durante 30 minutos a 3000 rpm usando agua a 4 °C. La preparación de la pasta consistió en mezclar 5,714 g del polvo de fosfato tricálcico alfa con 2 mL de la disolución de Na_2HPO_4 y poloxámero 407 previamente enfriada a 0 °C. La mezcla se llevó a cabo en un mezclador planetario de alta energía durante 20 segundos a 1650 rpm.

- Inmediatamente la pasta obtenida se incorporó en una jeringa de 5 mL de capacidad y con una apertura de 2 mm de diámetro. Las jeringas se colocaron durante 15 minutos en nitrógeno líquido e inmediatamente se colocaron a -80 °C en un congelador durante 3, 7, 14, 21 y 49 días. Después de estos tiempos las jeringas con la pasta de cemento se descongelaron durante 13 minutos en un baño de agua a 7 °C. La fuerza requerida para inyectar la pasta de cemento descongelada se determinó mediante el ensayo de inyección. El ensayo se realizó en una máquina universal de ensayos mecánicos (MTS Bionix 858) a una velocidad de avance del émbolo de la jeringa de 15 mm/min. La Figura 7 muestra que la fuerza necesaria para inyectar las pastas de cemento descongeladas no aumentó significativamente ($p > 0.05$) respecto a la fuerza necesaria para inyectar la pasta recién preparada a la misma temperatura. En todos los casos la pasta se inyectó en su totalidad puesto que el émbolo alcanzó el final del recorrido y no se observó pasta remanente en las jeringas. Las pastas descongeladas presentaron cohesión total al ser inyectadas en solución de Ringer (0,9 % en peso de NaCl en agua) a 37 °C. Los tiempos de fraguado inicial y final, medidos mediante el ensayo de las agujas de Gilmore después de los diferentes tiempos de congelación no cambiaron significativamente ($p > 0.05$) respecto a los tiempos de fraguado inicial y final (respectivamente) de pastas no

ES 2 553 302 B1

congeladas. Tampoco se encontraron cambios estadísticamente significativos ($p > 0.05$) en la resistencia a la compresión del cemento fraguado durante 7 días por el hecho de congelar y descongelar la pasta de cemento.

Breve descripción de las figuras

5 En las Figuras se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Curvas de inyección (fuerza - desplazamiento del émbolo) correspondientes a cementos con poloxámero 407 (líneas continuas) a 7 y 20 °C, y sin poloxámero 407 (líneas discontinuas) a 7 y 20 °C.

10 **Figura 2.** Fuerzas requeridas para inyectar las pastas de cemento termosensible a diferentes temperaturas (0, 7, 12, 15, 18 y 20 °C).

Figura 3. Imágenes de la cohesión de las pastas de cemento termosensible en solución de Ringer a temperaturas entre 0 y 37 °C. En todos los casos la temperatura inicial de la pasta fue de 18 °C.

15 **Figura 4.** Imágenes de la cohesión de las pastas de cemento termosensible mantenidas inicialmente a 0, 7 o 18 °C, al ser inyectadas en una solución de Ringer a 37 °C.

Figura 5. Imágenes de la cohesión de las pastas de cemento con diferentes cantidades de polvo y 2 mL de fase líquida, con y sin la incorporación de poloxámero 407.

Figura 6. Difracción de rayos X del producto de reacción de un cemento termosensible fraguado en solución de Ringer durante 7 días a 37 °C.

20 **Figura 7.** Fuerzas necesarias para inyectar las pastas de cemento termosensible después de 0, 3, 7, 14, 21 y 49 días de estar congeladas a -80 °C. En todos los casos las pastas se descongelaron e inyectaron a 7 °C.

Invencción escalable a aplicación industrial

25 Los cementos inorgánicos termosensibles que se han descrito presentan varias aplicaciones en el campo clínico y veterinario, especialmente en los campos de la cirugía ortopédica, para rellenar cavidades óseas, defectos craneales o cavidades después de remover un tumor, llenar espacios vacíos después de una fractura, fijar tornillos cuando se colocan placas metálicas, estabilizar fracturas óseas o recubrir prótesis e implantes, o en odontología para rellenar huecos después de quitar un diente o para aumentar la cantidad de hueso antes de la colocación de un implante dental. Esta invencción es fácilmente aplicable a escala industrial. La preparación del polvo y la fase líquida de los cementos es muy sencilla ya que todos los reactivos son comerciales y sólo se requiere la optimización del tamaño de partícula del polvo y la temperatura de la pasta para poder conseguir las ventajas enumeradas a continuación, las cuales incrementan el valor de dicho cemento en el ámbito de los biomateriales.

35 (a) Minimización de la fuerza necesaria para inyectar la pasta, facilitando el proceso de implantación mediante inyección;

(b) Obtención de cohesión total de la pasta cuando es inyectada a temperatura fisiológica;

(c) Fraguado rápido acompañado de resistencias a la compresión elevadas;

(d) Ausencia de subproductos tóxicos;

40 (e) Adherencia a tejidos vivos como el hueso;

f) Reabsorción *in vivo*.

ES 2 553 302 B1

Asimismo, la preparación del cemento es sencilla. El uso del cemento en aplicaciones biomédicas requiere la esterilización de los reactivos así como un empleo adecuado de éstos. Además, hay que introducir el cemento en el defecto óseo o dental en un tiempo corto, limitado por el endurecimiento de éste.

5 **REFERENCIAS**

- [1] G. Dumortier, J. L. Grossiord, F. Agnely, and J. C. Chaumeil, "A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics.," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 12, pp. 2709–28, Dec. 2006.
- 10 [2] J. Franco, P. Hunger, M. E. Launey, a P. Tomsia, and E. Saiz, "Direct write assembly of calcium phosphate scaffolds using a water-based hydrogel.," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 1, pp. 218–28, Jan. 2010.
- [3] J. Raymond and A. Schwarz, "Temporary embolization using inverse thermosensitive polymers," *US Pat. App. 10/794,804*, 2004.
- 15 [4] D. O'mahony and V. Garigapati, "Post irradiation shelf-stable dual paste direct injectable bone cement precursor systems and methods of making same," *US Pat. App. 13/ ...*, 2013.
- [5] M. P. Ginebra, J. A. Planell, and F. X. Gil, "Injectable, Self Setting Calcium Phosphate Foam," EP20050782615 200508112007.

ES 2 553 302 B1

REIVINDICACIONES

- 1.- Un cemento inorgánico termosensible de uso biomédico caracterizado porque comprende un cemento hidráulico inorgánico y un poloxámero, que se puede añadir bien en la fase sólida o bien en la fase líquida, dicha fase sólida del cemento hidráulico inorgánico comprende fosfatos de calcio, sodio y/o amonio, carbonatos de calcio, sulfatos de calcio, óxido de magnesio o cualquier mezcla de ellos, y la fase líquida es agua o una solución acuosa.
- 2.- Un cemento según la reivindicación 1 en el que el poloxámero se incorpora preferentemente en la fase líquida del cemento, que comprende agua destilada o una solución acuosa.
- 3.- Un cemento según la reivindicación 1, en que el componente autofraguable es fosfato tricálcico alfa.
- 4.- Un cemento según la reivindicación 1 en el que el poloxámero utilizado como aditivo es poloxámero 407, caracterizado porque el poloxámero 407 se puede incorporar como polvo en la fase sólida del cemento o preferentemente disuelto en la fase líquida del cemento.
- 5.- Un cemento según la reivindicación 4 en el que el poloxámero 407 se incorpora en la fase líquida del cemento en una concentración entre 10 y 30 % en peso, preferentemente 20 % en peso.
6. Un cemento según las reivindicaciones 3 a 5 en el que la fase líquida del cemento es preferentemente una solución acuosa de Na_2HPO_4 , con una concentración inferior al 10% en peso, preferentemente del 2.5% en peso.
- 7.- Un cemento según las reivindicaciones 3 a 5 en el que la mezcla de la fase líquida con la sólida se lleva a cabo a una proporción líquido-polvo entre 0,15 y 1,0 mL/g, preferentemente entre 0,2 y 0,4 mL/g.
- 8.- Un procedimiento para la preparación del cemento inorgánico termosensible para aplicaciones biomédicas donde la fase líquida formada por un hidrogel de poloxámero, a una temperatura inferior a 25 °C y preferentemente inferior a 12 °C, se mezcla con la fase en polvo del cemento, que comprende fosfatos de calcio, sodio y/o amonio, carbonatos de calcio, sulfatos de calcio, óxido de magnesio o cualquier mezcla de ellos.
- 9.- Un procedimiento para la preparación de un cemento inorgánico termosensible para aplicaciones biomédicas según la reivindicación 8 en el que la fase en polvo se encuentra preferentemente a una temperatura inferior a 25 °C, y más preferentemente inferior a 12 °C.
- 10.- Un procedimiento para la preparación de un cemento inorgánico termosensible para aplicaciones biomédicas según las reivindicaciones 8 y 9 en el que la fase en polvo comprende preferentemente fosfato tricálcico alfa.
- 11.- Un procedimiento para la preparación de un cemento inorgánico termosensible para aplicaciones biomédicas según la reivindicación 10 en el que la mezcla de la fase líquida con la sólida se lleva a cabo a una proporción líquido-polvo entre 0,15 y 1,0 mL/g, preferentemente entre 0,2 y 0,4 mL/g.
- 12.- Un procedimiento para la preparación del cemento inorgánico termosensible para aplicaciones biomédicas, según la reivindicación 8, donde la mezcla del polvo con la fase líquida se realiza preferentemente en un mezclador de alta energía.
- 13.- Un procedimiento para la preparación del cemento inorgánico termosensible para aplicaciones biomédicas, según la reivindicación 8, en el que la pasta una vez colocada en el interior de una jeringa o dispositivo similar se congela, preferentemente a temperaturas iguales o inferiores a -20 °C, para su almacenamiento, y posteriormente se descongela preferentemente a menos de 12 °C para su utilización en la aplicación clínica.

ES 2 553 302 B1

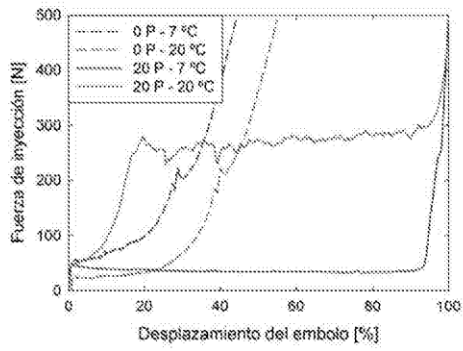


Fig. 1

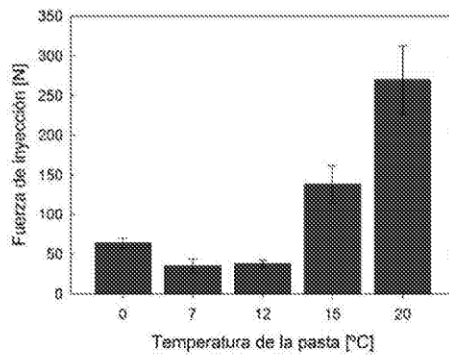


Fig. 2

ES 2 553 302 B1

Pasta inicialmente a 18 °C

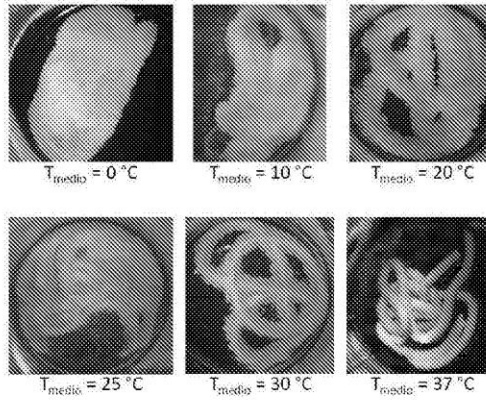


Fig. 3

Líquido de inmersión a 37 °C

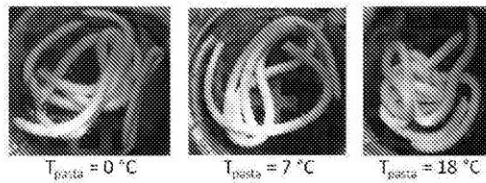


Fig. 4

ES 2 553 302 B1

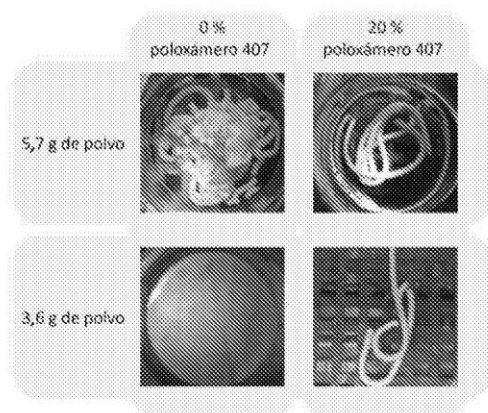


Fig. 5

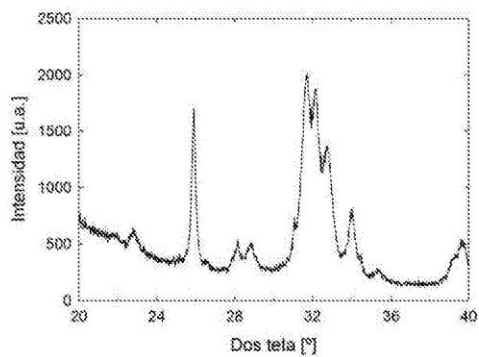


Fig. 6

ES 2 553 302 B1

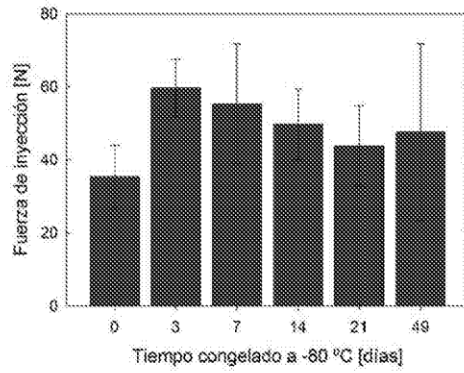


Fig. 7

11. Publications not included in the present thesis

- [1] C. Aparicio, Y. Maazouz, and D. Yang, "Measuring wettability of biosurfaces at the microscale," in *Nanotechnology in Regenerative Medicine: Methods and Protocols*, Humana Pre., M. Navarro and J. A. Planell, Eds. Springer-Verlag. Accepted (2010), 2010.
- [2] I. Ajaxon, Y. Maazouz, M.-P. Ginebra, C. Öhman, and C. Persson, "Evaluation of a porosity measurement method for wet calcium phosphate cements," *J. Biomater. Appl.*, vol. 30, no. 5, pp. 526–536, Nov. 2015.
- [3] D. Pastorino, Y. Maazouz, M.-P. Ginebra, and J. Gil Mur, "Biomateriales para la regeneración ósea: las claves del éxito," *Gac. Dent.*, vol. 1, no. 7, 2015.
- [4] A. Barba, A. Diez-Escudero, Y. Maazouz, K. Rappe, M. Espanol, E. B. Montufar, M. Bonany, J. M. Sadowska, J. Guillem-Marti, C. Öhman-Mägi, C. Persson, M. C. Manzanares, J. Franch, and M. P. Ginebra, "Osteoinduction by Foamed and 3D-Printed Calcium Phosphate Scaffolds: Effect of Nanostructure and Pore Architecture," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 48, pp. 41722–41736, 2017.
- [5] S. Raymond, Y. Maazouz, E. B. Montufar, R. A. Perez, B. González, J. Konka, J. Kaiser, and M. Ginebra, "Accelerated hardening of nanotextured 3D-plotted self-setting calcium phosphate inks," *Acta Biomater.*, May 2018.
- [6] M.-P. Ginebra, M. Espanol, Y. Maazouz, V. Bergez, and D. Pastorino, "Bioceramics and bone healing," *EFORT Open Rev.*, vol. 3, no. 5, pp. 173–183, May 2018.

